

Université de Montréal

**Effet du sécrétome des cellules sénescences sur
la réponse inflammatoire orchestrée par les macrophages**

Par Mireille Dessureault

Programme de Biologie moléculaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître es Sciences (M. Sc.)
en Biologie moléculaire option Générale

Juillet 2016

© Mireille Dessureault, 2016

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et post-doctorales

Ce mémoire intitulé :
**Effet du sécrétome des cellules sénescences sur
la réponse inflammatoire orchestrée par les macrophages**

Présenté par :
Mireille Dessureault

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Francis Rodier
- Co-directeur de recherche -

Dr. Jean-François Cailhier
- Co-directeur de recherche -

Dr. Gerardo Ferbeyre
- Président rapporteur -

Dr. Carlos Reyes-Moreno
- Membre du jury -

RÉSUMÉ

L'élimination des cellules sénescents met en jeu le SASP et les cellules immunitaires de l'immunité innée et adaptative tels que les macrophages (Mφ). Dans le cadre de ce projet, nous rapportons que le SASP a un effet pléiotropique sur l'activité des cellules immunitaires incluant leur recrutement, leur activation et leur différenciation. Nos données montrent que les Mφ humains mis en culture avec le SASP de fibroblastes humains développent un profil inflammatoire spécifique au SASP caractérisé par une sécrétion pro-inflammatoire (M1) (ex : IL-1β, GM-CSF) et des marqueurs de surface anti-inflammatoires (M2) (cellules CD23⁺CD206⁺). Le SASP est aussi capable d'augmenter les capacités d'invasion des Mφ, tel que montré via des essais d'invasion, mais n'a pas d'effet sur la différenciation des monocytes. Nos modèles de co-culture montrent que, quoique les cellules NK sont probablement responsables de l'élimination directe et spécifique des cellules sénescents, leur activité peut être modulée par d'autres cellules immunitaires tels que les Mφ qui réduisent l'élimination faite par les cellules NK, suggérant un profil M2. Les lymphocytes T CD8⁺ sont aussi essentiels pour l'élimination des cellules sénescents puisque leur retrait retarde le processus. De plus, nous démontrons que les cellules T CD4⁺ mises en culture pendant 48h dans le SASP sécrètent de hauts niveaux d'IL-4, indiquant une polarisation Th2. Somme toute, ces données montrent que le SASP peut moduler l'activité des Mφ tout comme celle d'autres cellules immunitaires impliquées dans l'élimination des cellules sénescents et peut promouvoir, étonnamment, une réponse immunosuppressive pouvant être importante pendant la réparation tissulaire.

Mots-clés : Inflammation, macrophages, sénescence, maladies liées au vieillissement, surveillance immunitaire, SASP, élimination des cellules sénescents, *senescence-messaging secretome*, cancer, cellules tueuses naturelles (NK), lymphocytes T CD4⁺, lymphocytes T CD8⁺.

ABSTRACT

Senescent cell clearance brings into play the senescence-associated secretory phenotype (SASP) and immune cells from the innate and adaptive immunity including macrophages (M ϕ). In this study, we report that the SASP has a pleiotropic effect on immune cell activity including recruitment, activation and differentiation. We show that human M ϕ exposed to the SASP of human fibroblasts develop a SASP-specific inflammatory profile characterized by pro-inflammatory (M1) secretion (e.g. IL-1 β , GM-CSF) and anti-inflammatory (M2) surface markers (CD23 and CD206). The SASP also increases M ϕ invasion but has no effect on monocyte differentiation. Co-culture models show that while NK cells are likely the direct effectors of senescent cell specific killing, their activity is modulated by other immune cells including M ϕ , which reduced NK-mediated killing, suggesting a M2 profile. Alternatively, CD8⁺ T lymphocytes are essential for senescent cell killing by NK cells. Finally, CD4⁺ T cells cultured for 48h in the SASP secrete high-levels of IL-4, indicating a Th2 polarization. Overall, our data reveal that the SASP can modulate M ϕ and other immune cells involved in senescent cell clearance and surprisingly promote an immunosuppressive response that could be important in tissue repair.

Keywords: Inflammation, macrophages, senescence, age-associated diseases, immune surveillance, SASP, senescent cell clearance, senescence-messaging secretome, cancer, natural killer cells, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells.

Table des matières

RÉSUMÉ	iv
ABSTRACT.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements	xiii
INTRODUCTION	14
1. Sénescence	14
1.1 Définition et caractéristiques.....	14
1.2 Phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP)	15
1.2.1 Composantes du SASP	15
1.2.2 Rôles du SASP	16
1.3 Rôle de la sénescence.....	17
1.3.1 Cancer.....	17
1.3.2 Vieillesse.....	17
1.3.3 Nouveaux rôles.....	18
1.4 La théorie de la pléiotropie antagoniste	19
2. Surveillance immunitaire.....	20
2.1 Immunité innée.....	20
2.1.1 Macrophages.....	20
2.1.1.2 Macrophages associés aux tumeurs (TAMs).....	23
2.1.1.3 Réversibilité du profil inflammatoire	24
2.1.2 Cellules tueuses naturelles (NK)	25
2.1.2.1 Balance d'activation	25
2.1.2.2 Types de cytotoxicité.....	26
3. Élimination des cellules sénescents.....	27
3.1 Résistance à l'apoptose	28
3.2 Caractéristiques facilitant leur élimination	28
3.2.1 Ligands de surface.....	28
3.2.2 Échange de protéines.....	29
3.3 Différents acteurs impliqués	30
3.3.1 Macrophages.....	30
3.3.2 Cellules tueuses naturelles (NK)	31
3.3.3 Autres acteurs	31
3.4 Raisons de leur accumulation.....	32
3.4.1 Immunosénescence.....	32
3.4.2 Évasion immunitaire.....	33
Prémisse	34
Hypothèse et objectifs.....	35
RÉSULTATS - Article.....	36
DISCUSSION	63
CONCLUSION	70

PERSPECTIVES 71
BIBLIOGRAPHIE..... 72

Liste des tableaux

Tableau 1. Sous-types de macrophages et leurs caractéristiques.....	23
Tableau 2. Sommaire des protéines les plus présentes dans le SASP et de leurs fonctions.	64

Liste des figures

Section introduction

Figure 1. Stimuli menant à une entrée en sénescence.....	15
Figure 2. L'entrée en sénescence et ses principales caractéristiques.....	16
Figure 3. Double rôle de la sénescence.....	19

Section résultats

Figure 1. Macrophages biological activity is influenced by the SASP.	56
Figure 2. Macrophages and other immune cells are reprogrammed by the SASP.	57
Figure 3. Immune cell populations and their role in senescent cell clearance.	58

Liste des abréviations

A

ADCC
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ·
ADN
Acide désoxyribonucléique ·
ALL
Acute lymphoblastic leukemia ·
APC
Antigen presenting cell ·
ATP
Adenosine triphosphate ·

B

BMDM
Bone marrow-derived macrophage ·
BSA
Bovine serum albumin ·

C

CB
Cytoplasmic bridge ·
CD
Cluster of differentiation ·
CDKI
Inhibiteur de kinase cycline-dépendante ·
CM
Conditioned media ·
CSF-1
Colony-stimulating factor-1 ·
CTL
Cytotoxic T lymphocyte ·
Ctrl
Control ·

D

DC
Dendritic cells ·
DDR
DNA damage response ·
DMEM
Dulbecco's Modified Eagle Medium ·
DNA-SCARS
DNA segment with chromatin alterations reinforcing senescence ·
DPBS
Dulbecco's phosphate buffered saline ·

F

FACS
Fluorescence-activated cell sorting ·
FasL
Fas ligand ·
FBS
Foetal bovine serum ·
FcR
Fc receptor ·

G

GADD45
Growth arrest and DNA damage-inducible 45 ·
GC
Glucocorticoid ·
GFP
Green fluorescent protein ·
GM-CSF
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ·
Gy
Gray ·

H

HLA
Human leukocyte antigen ·
HSC
Hepatic stellate cell ·
hTERT
Human telomerase reverse transcriptase ·

I

IC
Immune complex ·
ICAM
Intercellular adhesion molecule ·
IFN- γ
Interferon γ ·
IL
Interleukin ·
IPT
Intercellular protein transfer ·
IR
Ionizing radiation ·

K

KIR
Killer cell immunoglobulin-like receptors ·

L

LAK
Lymphokine-activated killer ·
LFA
Lymphocyte function associated antigen ·
LMP
Latent membrane protein ·
LPS
Lipopolysaccharide ·

M

M ϕ
Macrophages ·
MCP
Monocyte chemoattractant protein ·
M-CSF
Macrophage colony-stimulating factor ·
MDSC
Myeloid-derived suppressor cells ·
MFI
Mean fluorescence intensity ·
MHC
Major histocompatibility complex ·
MMP
Matrix metalloproteinase ·
MR
Mannose receptor ·
MSD
Meso Scale Discovery ·

N

NCR
Natural cytotoxicity receptor ·
NK
Natural killer ·
NO
Monoxide d'azote ·

O

O/N
Overnight ·
OIS
Oncogene-induced senescence ·

P

PBMC
Peripheral blood mononuclear cell ·
PBS
Phosphate buffered saline ·
PBTL
Peripheral blood T lymphocyte ·
PDGF
Platelet-derived growth factor ·
PDL
Programmed death ligand ·
pen-strep
penicillin-streptomycin ·
PMA
Phorbol-12-myristate-13-acetate ·
PUMA
p53 upregulated modulator of apoptosis ·

R

ROS
Reactive oxygen species ·
RPMI
Roswell Park Memorial Institute ·
RT
Room temperature ·

S

SA- β -Gal
Senescence Associated β Galactosidase ·
SAGA
Senescence-associated growth arrest ·
SAM
Senescence-accelerated mouse ·
SASP
Senescence associated secretory phenotype ·
SEN
Senescent ·
SF
Serum free ·
SLAM
Signaling lymphocytic activation molecule ·

T

TAM
Tumor-associated macrophage ·
TAP
Transporter associated with antigen processing ·
Teff
Effector T cell ·
TGF- β
Transforming growth factor β ·
Th

T helper ·
TLR
Toll-like receptor ·
TNF
Tumor necrosis factor ·
TNFRSF

Tumor necrosis factor receptor superfamily ·
TRAIL
TNF-related apoptosis inducing ligands ·
Treg
Regulatory T cell ·

Remerciements

Merci à Francis Rodier et à Jean-François Cailhier pour non seulement m'avoir accueillie dans leur équipe pendant les deux dernières années, mais aussi pour avoir développer ce projet si intéressant et prometteur. Merci pour vos conseils et les discussions enflammées tournant autour des macrophages et des cellules sénescences.

Merci à ma famille qui m'a toujours encouragée à poursuivre mes études le plus loin possible. Papa, maman, merci pour votre support malgré le fait que mon sujet de recherche reste parfois encore très obscur à vos yeux.

Merci à mon amoureux qui s'est occupé de moi en m'apportant, entre autres, bols de soupe, verres de limonade et beaux sourires pendant cette période de rédaction.

Un gros merci à tous les gens qui ont croisé mon chemin pendant ces deux ans de maîtrise au laboratoire et qui ont su partager avec moi leurs connaissances scientifiques afin de me faire passer de stagiaire gaffeuse à étudiante finissante à la maîtrise qui sait (un peu plus) ce qu'elle fait. Merci aussi à tous ceux qui ont partagé des rires et des sourires avec moi pendant cette période de ma vie.

Un énorme merci aux amis qui m'ont épaulé durant ma maîtrise et qui continueront de le faire pendant mon doctorat. Christine, encore aujourd'hui, même si nous ne partageons plus le même bureau, tu continues à partager ta sagesse avec moi. Merci à Marjorie et à David qui m'ont offert leurs suggestions pour l'écriture de ce document. David, ton aide a sans aucun doute été la plus précieuse que j'aie eue pendant mon parcours. Que ce soit par ta science infuse ou par nos discussions personnelles, tu as su être un ami d'exception. Merci encore pour tout ce que tu as fait pour moi, ça valait bien les vols de barres granola.

INTRODUCTION

1. Sénescence

1.1 Définition et caractéristiques

La sénescence, décrite pour la première fois il y a plus de 50 ans par Hayflick et Moorhead (1), est un mécanisme suppresseur de tumeur essentiel qui permet de prévenir la prolifération des cellules endommagées ou stressées. Elle peut être engendrée de diverses manières (Figure 1) : le raccourcissement des télomères, l'utilisation de drogues cytotoxiques, la radiation ionisante, le stress oxydatif et l'activation d'oncogènes (2). Soumise à un de ces stress cellulaires, la cellule aura pour première action d'immédiatement arrêter sa croissance (Figure 2). Par la suite, elle pourra se diriger vers trois destins cellulaires différents selon l'intensité des dommages qu'elle a subis. Si la cellule réussit à réparer les dommages, elle pourra retourner dans le cycle cellulaire. Toutefois, si les dommages sont trop importants, la cellule choisira plutôt d'entrer en mort cellulaire programmée, i.e. en apoptose, ou en sénescence. Les raisons guidant cette prise de décision sont encore peu comprises, mais plusieurs facteurs semblent entrer en compte. Tout d'abord, l'intensité des dommages en question, ainsi que leur nature, semblent jouer un rôle important. Par exemple, certains composés anticancéreux tel que l'étoposide engendrent la sénescence ou l'apoptose de manière dose dépendante, alors que d'autres tel que le busulfan induisent la sénescence peu importe la dose utilisée (3). Les niveaux d'expression et d'activation des protéines p53, un suppresseur de tumeur, et de p21, un inhibiteur de kinase cycline-dépendante (CDKI), auraient aussi un effet sur la voie choisie par la suite. Il existerait, par exemple, un seuil d'expression de p53 à dépasser pour que la cellule puisse entrer en apoptose (4). Enfin, le statut de la voie de signalisation PTEN/PI3K/AKT, régulant entre autres la prolifération cellulaire, permettrait aussi à la cellule d'orienter son choix (5).

La cellule pour laquelle la sénescence constitue le destin subit plusieurs changements en son sein : elle subit un arrêt de croissance stable, développe une activité *Senescence Associated β Galactosidase* (SA- β -Gal), des *DNA segment with chromatin alterations reinforcing senescence* (DNA-SCARS) et un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) (2). Les cellules sénescents expriment aussi de forts niveaux du suppresseur de tumeur p16^{INK4a}, un autre marqueur pouvant être utilisé en combinaison avec ceux mentionnés ci-dessus pour confirmer l'entrée en sénescence de cellules (6).

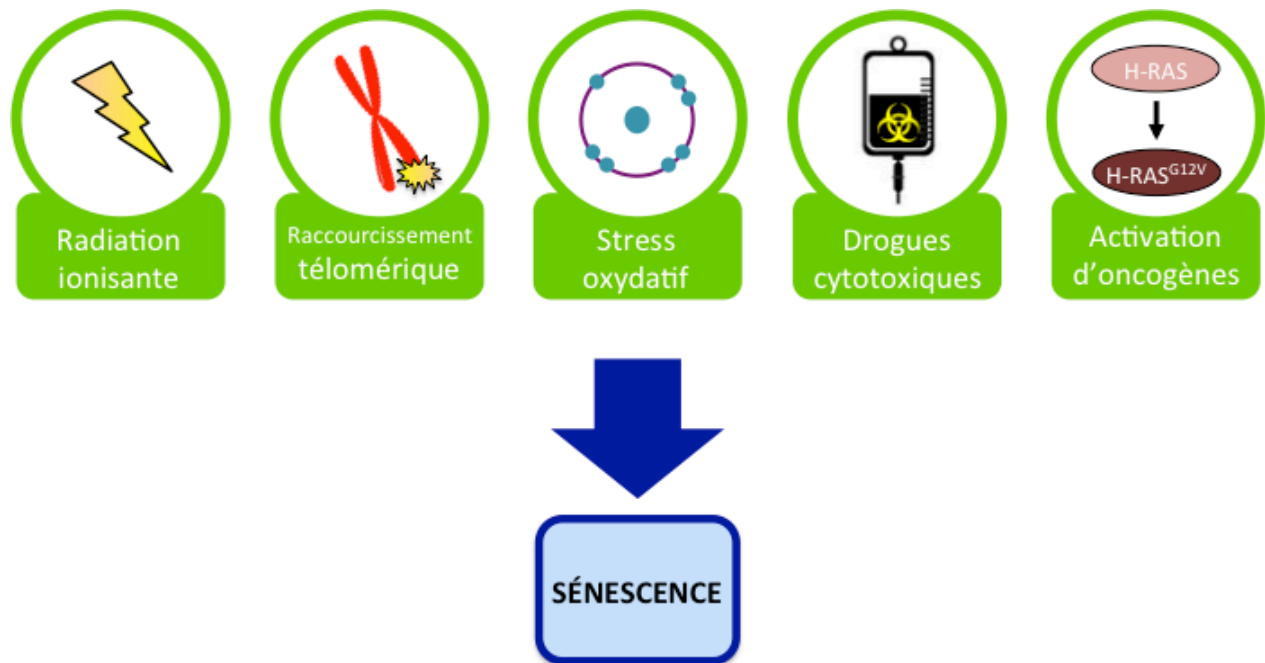


Figure 1. Stimuli menant à une entrée en sénescence.

Plusieurs phénomènes peuvent induire la sénescence cellulaire dans des contextes variés tels que le vieillissement et le traitement du cancer. Ces stimuli sont capables d'activer une chaîne de signalisation qui entraînera un arrêt de croissance et qui pourra par la suite aboutir à une entrée en sénescence.

1.2 Phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP)

Le développement du SASP est une caractéristique des cellules sénescentes qui n'apparaît pas immédiatement suivant le stress génotoxique. En effet, ce phénomène nécessite entre neuf et dix jours pour être complet, soit le temps que la signalisation associée aux dommages persistant à l'ADN s'établisse (7).

1.2.1 Composantes du SASP

Les différentes composantes du SASP ont déjà été étudiées dans des études précédentes (8). En effet, il est connu que le SASP contient plusieurs facteurs solubles tels que des interleukines (ex : IL-6), des chimiokines (ex : CXCL8, CCL2), des facteurs de croissance (ex : bFGF) et des protéases (ex : MMP-3). Le SASP est aussi riche en ligands (ex : ICAM-1), en récepteurs solubles (ex : sTNFRII), ainsi qu'en facteurs solubles non protéiques tels que les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et le monoxyde d'azote (NO). Enfin, le SASP contient des facteurs insolubles de la matrice extracellulaire telle que la fibronectine (8).

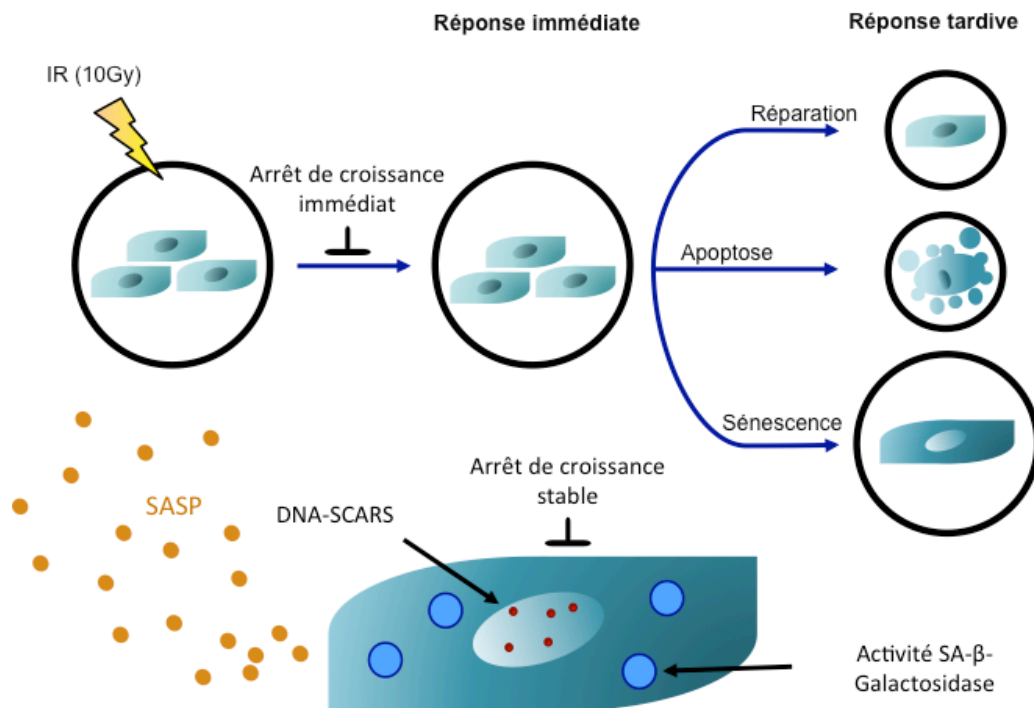


Figure 2. L'entrée en sénescence et ses principales caractéristiques.

Après avoir été mises en contact avec un stimulus induisant la sénescence, les cellules ont comme réponse immédiate un arrêt de croissance. Par la suite, selon l'intensité des dommages engendrés, les cellules pourront soit : 1) retourner dans le cycle cellulaire après avoir réparé leurs dommages 2) entrer en apoptose ou 3) entrer en sénescence cellulaire. Si les cellules entrent en sénescence, elles développeront un phénotype sénescents qui est caractérisé par : un arrêt de croissance stable, une activité β -Galactosidase, la présence de DNA-SCARS et la formation d'un SASP

1.2.2 Rôles du SASP

Étant donné ses diverses composantes, le SASP permet aux cellules sénescents de moduler leur microenvironnement et c'est pourquoi il est un des principaux responsables de l'effet bénéfique ou nuisible de la sénescence sur l'organisme. Deux rôles favorables du SASP sont présentement connus. Le premier est de renforcer l'arrêt de croissance de manière autocrine via la production, entre autres, d'IL-6 et de CXCL8 (9, 10). Ces protéines ont la capacité d'agir sur le cycle cellulaire en induisant l'expression de $p15^{\text{Ink4b}}$ et/ou de $p16^{\text{Ink4a}}$, des inhibiteurs de kinase cycline-dépendante 4/6 (CDK14/6), selon les cas (10). Le second effet positif du SASP est qu'il permet aux cellules immunitaires d'être recrutées suite à l'entrée en sénescence des cellules, et ainsi de favoriser l'élimination de celles-ci (11, 12).

En ce qui a trait aux effets nuisibles, le SASP peut faciliter la progression tumorale en favorisant, par exemple, la prolifération des cellules épithéliales pré-néoplasiques. Le SASP est responsable de 50% de cette capacité des cellules sénescences à promouvoir la prolifération des cellules pré-cancéreuses, les contacts cellulaires directs étant responsables du second 50% (13). La promotion tumorale se fait aussi via l'habileté du SASP à favoriser la migration et l'invasion des cellules pré-cancéreuses (14) en favorisant, entre autres, la transition épithélio-mésenchymateuse (15).

1.3 Rôle de la sénescence

Depuis la première caractérisation de l'état cellulaire que représente la sénescence, plusieurs rôles lui ont été attribués et contribuent à son attrait grandissant aux yeux de la communauté scientifique.

1.3.1 Cancer

L'un des premiers contextes dans lequel la sénescence a été impliquée est le cancer. Le lien entre la sénescence et le développement tumoral peut s'expliquer en mettant de l'avant les voies de signalisation impliquées dans ces deux processus. En effet, les voies p53 et pRb/p16^{INK4a} sont celles impliquées dans l'entrée en sénescence et il est bien connu que la mutation d'une ou deux de ces voies est présente dans la majorité des cancers (2, 16, 17). Aussi, la sénescence participe à la suppression tumorale en activant des voies de suppresseurs de tumeur qui empêchent la prolifération des cellules endommagées ou stressées pré-cancéreuses, par exemple, dans les naevi, aussi appelés grains de beauté (18, 19). De plus, il a été montré que l'inactivation de p53 bloque l'entrée en sénescence, tout en engendrant une progression tumorale accrue (17). Toutefois, il a aussi été démontré que la sénescence peut promouvoir la progression tumorale en favorisant entre autres la migration, l'invasion et la formation de métastases, tout comme la prolifération des cellules épithéliales pré-néoplasiques tel que mentionné ci-dessus (13).

1.3.2 Vieillesse

En plus de son implication dans le cancer, la sénescence, qui tire ses origines linguistiques du latin *senescere* signifiant vieillir, a un rôle non négligeable dans le vieillissement. Il a, en effet, été démontré que des cellules sénescences s'accumulent dans les tissus vieillissant (20-25) et que cette accumulation contribue au développement de maladies associées au vieillissement telles que

l'arthrose, la cirrhose du foie et l'athérosclérose (26-28). C'est entre autres grâce à l'utilisation du modèle de souris BubR1^{H/H};INK-ATTAC de Baker *et al.* que l'importance de la sénescence dans le processus de vieillissement a pu être confirmée. Ils ont démontré que l'élimination des cellules p16^{Ink4a} positives, donc sénescents, chez ces souris retarde l'apparition de phénotypes liés à l'âge tels que les cataractes, i.e. l'opacification du cristallin, la perte de tissus adipeux et la sarcopénie, i.e. la diminution de la masse musculaire, ou ralentit leur progression chez les souris déjà atteintes de ces maladies (29).

1.3.3 Nouveaux rôles

Récemment, les équipes des Drs. Serrano, Keyes et Campisi ont décrit de nouveaux rôles pour la sénescence : la formation des membres chez l'embryon (30, 31) ainsi que la réparation tissulaire (32). Tout d'abord, la sénescence a été associée au développement après avoir été identifiée de manière transitoire à des moments bien précis dans des embryons de poulets, de souris et d'humains montrant qu'il s'agit d'un mécanisme conservé au travers des espèces (31). De plus, la sénescence a été identifiée dans des structures et des régions précises lors du développement embryonnaire (31). Dans ce contexte, la sénescence aurait pour rôle de favoriser le remodelage tissulaire au cours du développement embryonnaire (30). Il a aussi été suggéré que la sénescence aurait un rôle favorable à jouer dans les échanges entre la mère et l'embryon au travers du placenta (33).

Toujours dans le domaine tissulaire, Demaria *et al.* ont présenté des évidences démontrant que les cellules sénescents sont présentes de manière transitoire aux sites de dommages tissulaires via un modèle de souris p16-3MR, où la présence de cellules sénescents peut être facilement étudiée via l'expression d'une protéine fluorescente rouge (RFP). Ce serait le *platelet-derived growth factor AA* (PDGF-AA) présent dans le SASP qui aurait pour effet de favoriser la réparation tissulaire. C'est pour cette raison que l'élimination des cellules sénescents via un traitement des souris au ganciclovir ralentit le processus de réparation (32). Cette relation entre sénescence et réparation tissulaire s'illustre aussi par l'accumulation d'hépatocytes sénescents dans le foie de souris traitées au CCl₄, donc en situation de fibrose. Les cellules sénescents hépatiques seraient capables d'encourager la résolution de la fibrose en empêchant l'accumulation de tissus fibrotiques via l'arrêt de croissance des hépatocytes responsables de la production de matrice extracellulaire et le recrutement des cellules immunitaires (12).

1.4 La théorie de la pléiotropie antagoniste

Les exemples précédents décrivent bien comment les cellules sénescences, de par leur SASP et leurs autres caractéristiques, sont une arme à double tranchant : pouvant être bénéfiques lorsqu'elles sont présentes de manière transitoire ou nuisibles en cas de persistance (Figure 3). Elle s'est donc rapidement intégrée à la théorie de la pléiotropie antagoniste qui explique qu'un gène ou un processus bénéfique à un organisme jeune peut être sélectionné malgré ses effets nuisibles chez l'organisme âgé (34, 35). La sénescence a ainsi été associée à la pléiotropie antagoniste de manière générale par la communauté scientifique, puisqu'elle semble importante pour le bon développement de l'organisme jeune, mais devient nuisible chez l'organisme vieillissant en favorisant la progression tumorale et le vieillissement via un épuisement des cellules progénitrices (36) et une perturbation de l'intégrité tissulaire (37). Toutefois, certains spécialistes remettent en question la sénescence comme représentation de la pléiotropie antagoniste puisque certains effets bénéfiques de la sénescence tels que la réparation tissulaire sont présents chez les adultes au même moment où les effets néfastes provoqués par l'accumulation des cellules sénescences sont présents (35).

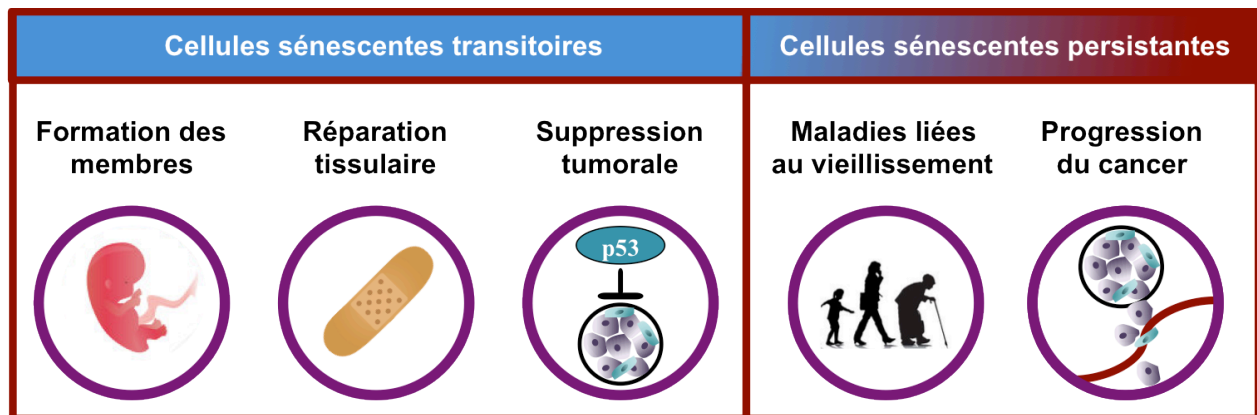


Figure 3. Double rôle de la sénescence.

Selon si la présence de cellules sénescences est transitoire ou persistante, la sénescence aura un effet bénéfique ou néfaste sur l'organisme. Une présence transitoire est associée à la formation des membres, à la réparation tissulaire et à la suppression tumorale. Une présence persistante, elle, est plutôt associée au développement de maladies liées au vieillissement et à la progression du cancer.

2. Surveillance immunitaire

Le principe de surveillance immunitaire englobe non seulement la surveillance des agents pathogènes, mais aussi celle des cellules pré-cancéreuses. Dans un modèle d'inflammation conventionnel, il existe une coopération entre les systèmes immunitaires innés et adaptatifs.

2.1 Immunité innée

L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme contre les dangers potentiels pouvant l'affecter. Elle regroupe différents acteurs ayant des activités de phagocytose, d'élimination directe ou de présentation antigénique : les macrophages ($M\phi$), les cellules tueuses naturelles (NK), les cellules dendritiques (DC), les monocytes, les mastocytes et les granulocytes (basophiles, neutrophiles et éosinophiles) (38). Dans le cadre de ce mémoire, nous nous concentrons sur la description des $M\phi$ et des cellules NK.

2.1.1 Macrophages

Identifiés il y a plus de 100 ans par le Dr. Metchnikoff, gagnant d'un prix Nobel pour leur découverte (39), les $M\phi$ dérivent des monocytes inflammatoires en circulation qui, une fois entrés dans le tissu, se développeront en macrophages sous l'effet de cytokines et de facteurs de croissance comme le *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), le *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) et le *colony-stimulating factor-1* (CSF-1) (40). Les monocytes représentent ~10% des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) et sont caractérisés par leur expression du marqueur de surface CD14, le co-récepteur du LPS (41). Ils dérivent des progéniteurs de cellules myéloïdes se trouvant dans la moelle osseuse qui donnent naissance aux monoblastes. Ces derniers se différencient en pro-monocytes et puis finalement en monocytes aptes à quitter la moelle osseuse pour entrer dans la circulation sanguine (39). Ce processus permettra de régénérer les niches de $M\phi$ résidant dans les tissus osseux (ostéoclastes), le système nerveux central (microglies), le foie (cellules de Kupffer), les poumons (macrophages alvéolaires), etc.

Les $M\phi$ résident donc dans les tissus et sont dans un état quiescent en absence d'un événement déclencheur (42). Ils dérivent principalement de la vésicule vitelline ainsi que du foie fœtal et sont ainsi formés lors du processus développemental (43-45). Ils sont un type de cellules myéloïdes hétérogènes bien connus pour maintenir l'homéostasie des tissus via leurs multiples

rôles et leur présence dans la totalité des tissus humains. Ces cellules sont aussi connues pour leur activité de phagocytose. Les macrophages ont pour principale fonction la phagocytose des érythrocytes (environ 200 milliards par jour), des débris cellulaires et des cellules mortes (39), afin d'éviter, entre autres, une réponse inflammatoire indésirable. Toutefois, en présence d'agents pathogènes néfastes pour l'organisme, les macrophages sont impliqués dans l'orchestration de la réponse inflammatoire en ayant un rôle primordial au cours des phases d'initiation et de résolution de processus telle la réparation tissulaire (43). Les macrophages ont ce pouvoir d'orchestration via leur habileté à influencer les cellules immunitaires; entre autres par leur capacité à traiter et à présenter les antigènes aux cellules T ayant pour fonction la distinction du soi et du non-soi. La présentation d'antigènes du non-soi par les macrophages permettra l'activation des cellules T qui entreront en phase d'expansion clonale avant de se différencier et d'agir en fonction des signaux reçus (46). Loin de se limiter à des interactions avec les cellules T, les macrophages sont aussi aptes à réguler l'activité des cellules NK. Ces dernières interagissent avec les macrophages via des contacts physiques directs ainsi que des facteurs solubles. Il est donc possible pour les macrophages d'inhiber les cellules NK en sécrétant, par exemple, du TGF- β 1 ou de les activer via une production d'IL-23 (47).

2.1.1.1 M1 et M2

De la même manière que les cellules T auxiliaires (*T helper cells*) ont un phénotype de polarisation Th1 ou Th2 (48), les macrophages différenciés peuvent avoir un phénotype M1, appelés macrophages classiques, ou M2, macrophages alternatifs. Ces deux grandes familles de macrophages se définissent par leurs marqueurs de surface, leurs profils de sécrétion, ainsi que par leur activité fonctionnelle (49). *In vitro*, un profil M1 est obtenu par l'ajout de ligands des récepteurs de type Toll (TLRs), tels que le lipopolysaccharide (LPS), l'interféron gamma (IFN- γ) ou le facteur de nécrose tumorale (TNF), alors que le profil M2 est généralement induit par l'ajout d'IL-10, d'IL-13 ou d'IL-4 (49-52). De manière générale, les macrophages M1 sont caractérisés par leur expression de CD80/86 et par leur sécrétion d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-12, d'IL-23, de CCL8, de CXCL10 et de TNF- α alors que les macrophages M2 expriment CD206, aussi appelé récepteur du mannose (MR), CD163 et sécrète de l'IL-10 et du *transforming growth factor* β (TGF- β). Ces deux extrêmes du spectre de polarisation des macrophages diffèrent principalement par le fait qu'un profil M1 est reconnu pour être pro-inflammatoire alors qu'un

profil M2 est anti-inflammatoire et associé à l'immunosuppression ainsi qu'à la réparation tissulaire.

Toutefois, la réalité n'est pas aussi simple. En effet, il existe plusieurs sous-types de macrophages M2 : M2a, M2b et M2c (Tableau 1). Ces trois sous-types de macrophages sont induits par des stimuli différents soit l'IL-4 et l'IL-13 pour les M2a, les complexes immuns (IC), le LPS ou l'IL-1 β pour les M2b et l'IL-10, le TGF- β et les glucocorticoïdes (GC) pour les M2c. Dans la littérature, les M2a représentent souvent le profil plus global des M2 et c'est pourquoi ils sont appelés macrophages alternatifs. Les M2b sont connus comme étant les macrophages de type II alors que les M2c sont identifiés comme étant les macrophages désactivés (53). Du point de vue de la sécrétion, les M2a produisent surtout de l'IL-1ra et du TGF- β , alors que les M2b sont caractérisés par une sécrétion de TNF- α , d'IL-10, d'IL-1 β et d'IL-6. Les M2c sont surtout caractérisés par la sécrétion de TGF- β et d'IL-10. Ces trois sous-types se différencient aussi au niveau des chimiokines qu'ils sécrètent, des marqueurs de surface qu'ils expriment et des processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués (Tableau 1).

Tableau 1. Sous-types de macrophages et leurs caractéristiques.

Phénotype	Sous-types de Mφ	M1 (classique)	M2		
			M2a (alternatif)	M2b (type II)	M2c (désactivé)
Inducteurs		IFN- γ , GM-CSF, LPS, TNF- α ,	IL-13, IL-4	IC, LPS, IL-1 β	GC, IL-10, TGF- β
Cytokines		IL-1 β , -12, -23, -6, TNF- α	IL-10, -1ra, TGF- β ,	IL-10, -1 β , -6, TNF- α	IL-10, TGF- β
Chimiokines		CCL-2, -3, -4, -5, -8, -11, -17, -19, -20, -22, CXCL-1, -2, -3, -5, -9, -10, -11, -16	CCL-17, -18, -22, -24	CCL-1, -20, CXCL-1, -2, -3	CCL-16, -18, CXCL-13
Marqueurs		MHC II, CD80/86, iNOS	MHC II, CD163, CD206	MHC II, CD86	CD163, CD206
Rôles		Inflammation Th1, Anti-microbe, Dommages tissulaires, Anti-tumoral	Inflammation Th2, Anti-parasite, Allergie, Réparation tissulaire	Inflammation Th2, Anti-parasite, Allergie, Régulation immunitaire	Inflammation Th2, Suppression immunitaire, Réparation tissulaire, Pro-tumoral

Les macrophages peuvent être caractérisés selon leur profil de sécrétion, leurs marqueurs de surface et leurs rôles. Les macrophages polarisés M1, appelés classiques, ont des fonctions anti-tumorales et sont associés à une réponse inflammatoire Th1. Les macrophages polarisés M2, eux, se divisent en trois sous-types : M2a (alternatifs), M2b (type II) et M2c (désactivés). Ces sous-types diffèrent dans leur sécrétion de cytokines et de chimiokines tout en étant impliqués dans des processus biologiques différents. Étant tous présents lors d'une réponse Th2, ils peuvent avoir un rôle à jouer dans la réponse allergique, la réparation tissulaire, la régulation immunitaire, etc.

2.1.1.2 Macrophages associés aux tumeurs (TAMs)

Considérant que les macrophages ont un rôle à jouer dans le maintien de l'homéostasie d'une multitude de tissus, il n'est pas étonnant que leur dysfonctionnement soit associé à diverses maladies : neurodégénération, cancer, fibrose, athérosclérose, ostéoporose, obésité, diabète, etc. (52-55). Une augmentation de la densité des macrophages est corrélée avec un mauvais pronostic du cancer dans la majorité des organes : œsophage, foie, sein, thyroïde, vessie, peau, etc. (56, 57). Dans un contexte de cancer, des macrophages sont retrouvés dans le microenvironnement tumoral et semblent favoriser la formation de métastases ainsi que la croissance tumorale (58, 59). Toutefois, le rôle des macrophages associés aux tumeurs (TAMs) ne serait pas toujours le même selon le type de cancer. En effet, des évidences montrent que les TAMs auraient un rôle

bénéfique dans des contextes de cancer du poumon, de la prostate et du cerveau (60). Les TAMs ont un profil ressemblant aux macrophages M2 et sont connus pour être immunosuppresseurs, d'où la corrélation existant entre le nombre de TAMs présents dans la tumeur et, de manière générale, le mauvais pronostic du patient (61). Ils ont de forts niveaux d'expression de CD206, ne sont pas de bons présentateurs d'antigènes (55) et leur sécrétome est caractérisé par une forte sécrétion d'IL-10 combinée à une faible sécrétion d'IL-12 (62). Les TAMs sécrètent des enzymes capables de dégrader la matrice extracellulaire telles que les métalloprotéinases et les protéases à cystéine et à cathepsine ce qui leur permet de remodeler le microenvironnement tumoral. En effet, ces enzymes vont être capables de modifier leur environnement de manière à promouvoir l'invasion et la formation de métastases par les cellules cancéreuses (54, 55). Une faible fraction des TAMs provient des macrophages résidents. En effet, ceux-ci sont majoritairement des monocytes nouvellement recrutés par la tumeur produisant de grandes quantités de *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1 ou CCL2) et induits par la suite à se différencier sous l'effet de l'IL-4, de l'IL-10 et de l'IL-13 sécrétés par les cellules cancéreuses et les leucocytes infiltrant la tumeur (56).

2.1.1.3 Réversibilité du profil inflammatoire

Une des raisons pour lesquelles les macrophages, M1 ou M2, sont capables d'orchestrer la réponse inflammatoire est qu'ils ont l'habileté de changer de profil inflammatoire au fil du temps en réponse à des signaux environnementaux. En effet, il a entre autres été démontré que les macrophages sont capables de passer d'un profil anti-inflammatoire à un profil pro-inflammatoire. Par exemple, des TAMs qui, dans le microenvironnement tumoral avaient une faible activité de NF- κ B, ont pu être transformés en macrophages pro-inflammatoires lorsque l'inhibition de NF- κ B a pu être levée en sortant les TAMs de leur environnement initial (57). Une seconde étude a exposé le caractère réversible des macrophages en montrant que les TAMs pro-tumoraux peuvent être réorientés vers un profil anti-tumoral en utilisant des oligonucléotides CpG, ligands du récepteur de type Toll 9 (TLR9) favorisant une activité pro-inflammatoire, et de l'anti-IL-10R bloquant le récepteur de l'IL-10 et ainsi une réaction anti-inflammatoire des macrophages (58).

2.1.2 Cellules tueuses naturelles (NK)

Les cellules NK sont reconnues principalement pour leur activité cytolytique. Ce sont des cellules CD3⁻ qui comptent pour 15% des leucocytes totaux et qui ont pour rôle d'éliminer les cellules pré-cancéreuses ou infectées par des virus (59). Cette reconnaissance se fait via un principe de soi manquant qui comprend une reconnaissance des cellules cibles par les cellules NK via des changements dans les niveaux d'expression des complexes majeurs d'histocompatibilités de classe I (MHC I) des cellules cibles. Ainsi, ces cellules sont reconnues comme du non soi et deviennent alors une cible de choix pour les cellules NK qui sont capables d'induire une lyse et ainsi produire des débris cellulaires ayant un potentiel antigénique, pouvant donc être phagocytés par les cellules présentatrices d'antigènes (APC). Ces dernières pourront ensuite effectuer de la présentation antigénique aux cellules T afin d'activer l'immunité adaptative. Les cellules NK ont un rôle situé à la limite entre l'immunité innée et adaptative puisqu'elles régulent autant les APC tels que les macrophages et les cellules dendritiques (DC) que la réponse adaptative des lymphocytes T. Les cellules NK ont aussi des caractéristiques de l'immunité adaptative telles qu'une spécificité pour les cellules non saines et une importante capacité de prolifération au cours de la réponse inflammatoire afin d'assurer le maintien d'une réponse appropriée (60).

2.1.2.1 Balance d'activation

L'activation des cellules NK se fait via une balance entre les signaux activateurs, via la liaison de ligands sur leurs cibles, et inhibiteurs, associés à la reconnaissance des MHC de classe I. Les récepteurs qui sont considérés comme activateurs sont NKG2D, ainsi que les *natural cytotoxicity receptors* (NCR) : NKp30, NKp44 et NKp46. Dans l'optique de compléter l'effet de ces récepteurs d'activation, les cellules NK possèdent des récepteurs de co-stimulation tels que CD2, CD226, NKp80 ainsi que 2B4 (CD244) faisant partie de la famille des *signaling lymphocytic activation molecules* (SLAMs) (61). Les MHC de classe I, eux, sont reconnus par les *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIRs) (61).

Il existe deux principaux sous-types de cellules NK : CD56^{fort}CD16^{faible/-} et CD56^{faible}CD16⁺. La population CD56^{fort}CD16^{faible/-} représente 90% des cellules NK dans les ganglions, alors que la population CD56^{faible}CD16⁺ constitue 90% des cellules NK en circulation (62). Du point de vue fonctionnel, les CD56^{faible}CD16⁺ sont reconnues pour leur forte activité cytotoxique, alors que les

CD56^{fort}CD16^{faible/-} vont plutôt avoir un rôle de régulateurs immunitaires via la sécrétion d'IFN- γ , de TNF- β , d'IL-10, -13 et de GM-CSF (63) suite à leur activation par l'IL-12, -15 et -18.

2.1.2.2 Types de cytotoxicité

La cytotoxicité des cellules NK peut être causée de trois différentes manières : naturelle, induite par les lymphokines ou induite par les anticorps. La cytotoxicité naturelle est engendrée par un passage d'une balance penchant en faveur de l'inhibition à une balance favorisant l'activation des cellules NK suite à une activation des NCRs et/ou une perte d'activation des KIRs. Les cellules NK activées par les lymphokines, s'appellant *lymphokine-activated killers* (LAKs), développent leur cytotoxicité suite à une sécrétion, par exemple, d'IL-2 par les lymphocytes du microenvironnement. Enfin, la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) intervient lorsqu'il y aura une interaction entre le domaine Fc de l'anticorps porté par la cellule cible et le récepteur Fc (FcR) des cellules NK, principalement CD16 (aussi appelé Fc γ RIIIA).

Une fois les cellules NK activées, elles peuvent utiliser divers modes d'élimination : l'exocytose de granules contenant la perforine et le granzyme, l'activation des récepteurs de mort et la sécrétion d'IFN- γ ou de monoxyde d'azote (NO) (59). La voie principale d'induction de l'apoptose est celle utilisant l'exocytose de granules contenant la perforine et le granzyme suite à la formation de la synapse immunologique. La perforine a pour rôle de perméabiliser la membrane cellulaire cible afin que le granzyme B puisse entrer dans la cellule et aller cliver les caspases cibles, ce qui induit une cascade menant à l'apoptose. La perforine agit donc de manière extracellulaire, alors que le granzyme a un effet intracellulaire. Cette induction peut aussi être indépendante de la voie des caspases. La voie d'induction de mort cellulaire via les récepteurs de mort est elle aussi beaucoup utilisée par les cellules NK. Elle fait intervenir des ligands de la famille des TNF tels que les *TNF-related apoptosis inducing ligands* (TRAILs) et les *Fas ligands* (FasLs) présents sur les cellules NK (59). Ainsi, les cellules NK peuvent se lier aux cellules cibles exprimant les récepteurs associés à ces ligands afin d'engendrer leur mort. Les cellules NK sont même capables de favoriser la surexpression de ces récepteurs sur leurs cibles afin de mieux les cibler.

Les cellules NK ont divers rôles biologiques tels que le contrôle des infections virales, la protection contre l'auto-immunité et la suppression tumorale. La voie perforine/granzyme et celle des récepteurs de mort sont toutes deux utilisées par les cellules NK dans le contexte de l'élimination des cellules cancéreuses. L'implication qu'ont les cellules NK dans le cancer a été

démontrée plusieurs fois via des modèles de souris dans lesquelles la déficience en cellules NK, suite à l'utilisation d'anticorps, ralentit le rejet des cellules tumorales (64). Les cellules NK sont donc impliquées dans la biologie tumorale et dans celle des métastases via, entre autres, leur capacité à reconnaître les cellules cancéreuses qui diminuent l'expression des molécules MHC de classe 1. Toutefois, l'efficacité d'une immunothérapie utilisant les cellules NK reste encore à être déterminée puisque les résultats d'études cliniques ne montrent pas de réel effet sur les tumeurs solides, suggérant une efficacité des cellules NK seulement sur les tumeurs en circulation (62).

3. Élimination des cellules sénescences

Les bénéfices liés à l'élimination des cellules sénescences ont été mis de l'avant par le laboratoire du Dr. Jan M. van Deursen notamment via leur utilisation d'un modèle de souris progéroïdes contenant un transgène INK-ATTAC. Dans ce modèle, les cellules sénescences exprimant p16^{Ink4a} peuvent être éliminées par induction de l'apoptose grâce à l'administration d'une drogue, l'AP20187. Les souris traitées avec cette drogue développent plus tardivement des maladies associées au vieillissement telles que la sarcopénie, les cataractes et la perte de tissus adipeux. De plus, les souris traitées présentent une nette préservation de la fonction des muscles. Baker *et al.* ont aussi pu montrer que l'élimination des cellules sénescences chez les souris âgées ralentissait la dysfonction des organes associée au vieillissement (29).

Afin d'étudier l'effet des cellules sénescences dans un contexte réel de vieillissement et non dans un modèle accéléré tel que précédemment, cette même équipe a effectué une deuxième étude montrant encore une fois que l'accumulation de cellules sénescences est liée à la perte de tissu adipeux, mais aussi à la glomérulosclérose, maladie associée à une diminution de l'efficacité rénale (65). L'élimination des cellules sénescences positives pour p16^{Ink4a} a aussi engendré un prolongement de l'espérance de vie des souris traitées d'une manière indépendante de l'apparition de tumeurs. Somme toute, ces souris avaient une apparence plus saine. Dans cette nouvelle étude, Baker *et al.* montrent aussi que l'accumulation des cellules sénescences est liée au vieillissement du cœur puisque, chez les souris traitées, il y avait un nombre accru de cardiomyocytes ventriculaires. Cet état de santé amélioré se traduit aussi par un maintien de la tolérance cardiaque au stress via la conservation des niveaux de Sur2a cardiaques, une sous-unité régulatrice des canaux de potassium dépendant de l'adénosine triphosphate (K_{ATP}) (65).

Considérant les effets négatifs relatifs à l'accumulation des cellules sénescences, comprendre

pourquoi et comment elles s'accumulent dans les tissus est particulièrement important. Il a aussi été démontré que si l'élimination des cellules sénescents se fait de manière trop précoce, l'organisme ne peut pas profiter de leurs effets bénéfiques. Par exemple, l'élimination hâtive des cellules sénescents retarde la réparation tissulaire puisque celles-ci n'ont pas le temps de participer correctement au processus via la sécrétion du PDGF-A (32). Ainsi, il ne s'agit pas seulement d'élucider leur processus d'élimination, mais aussi de comprendre la chronologie des événements afin de pouvoir éliminer les cellules sénescents au bon moment.

3.1 Résistance à l'apoptose

Les cellules sénescents sont résistantes à l'apoptose et nécessitent donc une intervention du système immunitaire pour être éliminées. Cette résistance peut être expliquée par la préférence de p53, une fois phosphorylé et stabilisé suite au stress cellulaire, pour les promoteurs de gènes entraînant l'arrêt du cycle cellulaire tels que p21 et GADD45 (*Growth arrest and DNA damage-inducible 45*) plutôt que ceux de gènes promouvant l'apoptose tels que TNFRSF10b (*Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b*) et PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) (66). Cette résistance peut aussi découler de la forte expression de protéines anti-apoptotiques de la famille des protéines régulatrices de l'apoptose telles que Bcl-2 (67, 68) et Bcl-xL (69) chez les cellules sénescents. Comprenant ainsi l'incapacité des cellules sénescents à entrer d'elles-mêmes en mort programmée, il est important de s'intéresser au processus d'élimination non autonome des cellules sénescents par le système immunitaire.

3.2 Caractéristiques facilitant leur élimination

3.2.1 Ligands de surface

La radiation ionisante, un stimulus capable d'induire la sénescence, engendre la surexpression de ligands pouvant être reconnus par les cellules immunitaires et pouvant ainsi provoquer une élimination, par le système immunitaire, des cellules exprimant ce type de ligands. C'est par exemple le cas de ICAM-1 (*InterCellular adhesion molecule 1*) qui est plus fortement exprimée chez les cellules sénescents que celles en prolifération (70). Ce ligand de surface peut être reconnu par LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*), un récepteur se trouvant à la surface des cellules NK et dont l'activation est suffisante pour engendrer la polarisation des granules lytiques (60, 71).

Les cellules sénescences surexpriment aussi les ligands NKG2D suite à un stress cellulaire tel un traitement par radiations ionisantes (72). Ces ligands sont des protéines reliées au MHC de classe I tels que, chez l'humain, MICA, MICB et la famille de protéines ULBP. Ces ligands sont reconnus par les cellules NK, les cellules T CD8⁺ cytotoxiques, les cellules T gamma delta ($\gamma\delta$), un sous-groupe de cellules T CD4⁺, et les macrophages exprimant les récepteurs associés (73-75). Ce n'est seulement que récemment que la démonstration du lien existant entre l'élimination des cellules sénescences et l'expression des ligands NKG2D a été faite (76). Le laboratoire du Dr. Krizhanovsky a montré que l'élimination des cellules sénescences était dépendante de l'expression des ligands NKG2D *in vitro* et *in vivo* lors de la réparation tissulaire. Ils ont démontré que les ligands MICA et ULBP2 étaient surexprimés à la surface des cellules en partie grâce à l'activation de la voie de réparation des dommages à l'ADN (DDR) et de l'activité de ERK (76). La présence de ces ligands à la surface des cellules cibles participe donc à l'activation des cellules immunitaires possédant les récepteurs correspondant, mais il semblerait que la situation ne soit pas si simple. En effet, les ligands NKG2D subissent de nombreuses modifications transcriptionnelles, post-transcriptionnelles et post-traductionnelles qui vont permettre de moduler leur expression (73). Par exemple, ils peuvent être clivés par des métalloprotéinases (ex : ADAM10) et des métalloprotéinases matricielles (MMPs) (ex : MMP9) (77, 78) et ainsi bloquer l'effet bénéfique, qu'avaient au départ ces ligands, en bloquant l'expression du récepteur tout comme la reconnaissance du ligand exprimé sur la cible (73, 79). Le SASP, tel que mentionné précédemment, contient des MMPs, donc il serait intéressant de savoir si celles-ci ont un effet négatif sur l'expression des ligands NKG2D présentés par les cellules sénescences. Les métalloprotéinases ont aussi été, par le passé, impliquées dans l'évasion tumorale (80, 81).

3.2.2 Échange de protéines

Les cellules sénescences utilisent, en plus de leur sécrétome et de leurs ligands de surface, le transfert intercellulaire de protéines (IPT) pour communiquer avec les cellules immunitaires. Il est en effet possible pour une cellule de faire passer un message à sa voisine immédiate ou lointaine via des protrusions membranaires appelées ponts cytoplasmiques (CB) (82). Cela permet de transférer directement des protéines provenant de compartiments cellulaires différents tout comme des organelles trop grosses pour passer par les jonctions gap. Ces ponts existent sous plusieurs formes et longueurs, dont les nanotubes membranaires qui sont de longues structures

permettant les communications à longue distance (83-86). Cette récente découverte n'est pas étonnante puisqu'il est déjà connu que les interactions directes avec les cellules voisines jouent un rôle important dans l'effet que les cellules sénescents peuvent avoir sur leur environnement (13). Les cellules sénescents transfèrent en effet des protéines aux cellules épithéliales et cancéreuses (82) ce qui explique leur influence sur la prolifération des cellules épithéliales et la progression tumorale (13). Ce type de communications intercellulaires pourrait donc aussi être utilisé pour communiquer avec des cellules immunitaires, telles que les cellules NK. Il a déjà été montré que les nanotubes facilitent les interactions entre les cellules NK et leurs cibles afin d'augmenter leur efficacité d'élimination (83).

3.3 Différents acteurs impliqués

Il est dorénavant clair que les cellules sénescents peuvent utiliser divers mécanismes pour communiquer avec les cellules immunitaires et ainsi engendrer leur élimination : ligands de surface (76), sécrétion de facteurs pro-inflammatoires (8) et échange de protéines (82). Toutefois, les acteurs spécifiques responsables de l'élimination des cellules sénescents, eux, sont encore mal définis bien que plusieurs pistes semblent indiquer une coopération de plusieurs types de cellules immunitaires.

3.3.1 Macrophages

Les macrophages, de par leur important rôle de maîtres d'orchestre, ont sans aucun doute un rôle à jouer dans l'élimination des cellules sénescents. Tout d'abord, il a été montré que les macrophages infiltrent les tissus sénescents et s'accumulent près des cellules sénescents exprimant p53, p21 et Hmga1 (11, 12, 87). L'importance des macrophages a été démontrée de manière plus concrète dans le cadre de ce processus en montrant que leur déplétion affecte la surveillance immunitaire chez les souris (11, 87, 88). Dans un modèle de dommages chroniques au foie, l'exposition des macrophages résidents du foie (les cellules de Kupffer) ou infiltrant (les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM)) au milieu conditionné (CM) des cellules stellaires hépatiques (HSC) contrôle induit l'expression des gènes Mrc1 et Msr1 associés à un profil anti-inflammatoire M2. Toutefois, l'utilisation de CM provenant des HSC sénescents induit, lui, l'expression du gène IL-1 β associé à un profil pro-inflammatoire M1 (89). Un anticorps bloquant l'arrivée de nouveaux macrophages formés à partir des monocytes pro-inflammatoires a été utilisé afin de départager le rôle des macrophages résidents et celui des

macrophages nouvellement formés. Chez ces souris, la surveillance des cellules sénescents n'a pas pu être effectuée correctement indiquant donc un rôle important pour les macrophages nouvellement formés, mais pas pour les macrophages résidents (88).

3.3.2 Cellules tueuses naturelles (NK)

Les cellules immunitaires semblant le plus impliquées jusqu'à présent dans l'élimination directe des cellules sénescents sont les cellules NK. Il a d'abord été montré que les cellules NK infiltrent les tissus sénescents, tout comme les macrophages, et s'y accumulent (11, 12, 88). Les cellules NK utiliseraient l'exocytose de granules pour tuer les cellules sénescents plutôt qu'un mécanisme d'apoptose utilisant les récepteurs de mort tels que les récepteurs de FasL et de TRAIL (71). Cette découverte va de pair avec celle montrant l'interaction des cellules sénescents avec les cellules immunitaires via les ligands NKG2D (76) puisque la reconnaissance de ces ligands par les cellules NK favoriserait la mort par exocytose de granules (90). L'élimination retardée de tumeurs sénescents chez des souris déficientes en ligands NKG2D ou traitées avec des anticorps contre ces ligands démontre bien l'importance qu'ont les cellules NK dans ce processus (91). Les interférons de type 1 produits par les cellules sénescents semblent aussi importants dans le cadre de l'élimination puisqu'ils favorisent l'expression des ligands NKG2D MICA et ULBP2. Le blocage de ces interférons diminue l'efficacité des cellules NK à éliminer les cellules sénescents (92). Utilisant une lignée cellulaire de cellules NK, soit les cellules YT, le groupe de Krizhanovsky a aussi montré que les cellules NK sont capables de cibler préférentiellement les cellules sénescents *in vitro* et ce peu importe le type de stimulus utilisé pour engendrer l'entrée en sénescence (ici les dommages à l'ADN et la sénescence répllicative). *In vivo*, la déplétion des cellules NK via un anticorps bloquant empêche la bonne élimination des cellules sénescents (11, 12) dans certains cas alors que dans d'autres elle ne semble avoir aucun effet sur la surveillance immunitaire (88).

3.3.3 Autres acteurs

En plus des macrophages et des cellules NK, d'autres types de cellules immunitaires collaborent dans l'objectif de mener à bien l'élimination des cellules sénescents. Par exemple, l'induction de la sénescence engendre aussi le recrutement des cellules NKT (93), des neutrophiles (11, 12, 87, 88), des monocytes (88) et des DC (88). Il a aussi été montré que la perte de fonction des neutrophiles retarde la régression tumorale de manière significative suite à

la réactivation de p53 (11). Une augmentation de l'influx de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ a aussi pu être observée suite à une entrée en sénescence des cellules du foie. Il semble que la surveillance des cellules sénescents est complètement absente chez les souris qui sont déplétées en cellules T CD4⁺ ou qui n'en ont pas depuis la naissance. Ces lymphocytes T CD4⁺ auraient une polarisation Th1 i.e. pro-inflammatoire puisque ni l'IL-4 ni l'IL-17 n'ont pu être détectés chez les splénocytes de ces souris. La déplétion par anticorps des cellules T CD4⁺ a aussi provoqué un développement de tumeurs au foie plus important chez des souris ayant seulement 3 mois. L'injection de cellules T CD4⁺ chez les souris déplétées en cellules T CD4⁺, macrophages et cellules NK n'est toutefois pas suffisante pour un retour à 100% de la surveillance des cellules sénescents. Cela démontre donc que les cellules T CD4⁺ agissent probablement en auxiliaires et que l'immunité innée est nécessaire pour l'élimination efficace des cellules sénescents (88).

3.4 Raisons de leur accumulation

Au fil des années, les cellules sénescents s'accumulent et contribuent au développement de maladies associées au vieillissement. Il va sans dire que ce déséquilibre entre leur apparition et leur élimination par les cellules immunitaires est problématique. Ainsi, il est aussi important d'élucider la cause de ce déséquilibre.

3.4.1 Immunosénescence

La détérioration du système immunitaire associée au processus de vieillissement est appelée immunosénescence. Celle-ci pourrait constituer une des causes menant à l'accumulation des cellules sénescents. En effet, le vieillissement du système immunitaire mène à une perte de fonction de l'immunité adaptative, tout comme de l'immunité innée, quoique cette dernière semble être moins affectée par le cours du temps (94). Au cours du processus de vieillissement, il est connu que non seulement les sous-populations de lymphocytes ont tendance à changer, mais aussi que la taille du thymus, un organe lymphoïde primaire permettant la maturation et la prolifération des cellules T naïves, réduit en taille. Ainsi, suite à cette perte de microenvironnement adapté à leur développement, les cellules T naïves réduisent en nombre, ce qui affecte la qualité de la réponse immunitaire (95).

En plus des changements de composition du système immunitaire, l'organisme peut être affecté par l'entrée en sénescence répliquative des cellules immunitaires (96) suite au raccourcissement de leurs télomères au fil des divisions qui peuvent être nombreuses, par exemple en cas de

prolifération des cellules T CD8⁺ engendrée par une présentation d'antigènes (97). Ces cellules immunitaires sénescents vont exprimer des marqueurs typiques associés à la sénescence tels que p16^{INK4a} qui augmente de manière marquée chez les lymphocytes T dérivés du sang périphérique (PBTL) (98).

Les cellules NK, qui semblent être en charge de l'élimination des cellules sénescents, semblent aussi être sujettes à la sénescence répliquative (99). Des évidences ont aussi prouvé que les cellules NK perdaient de leurs capacités cytotoxiques au fil du temps via la diminution d'adhésion des perforines à la surface des cellules cibles (100). Cette perte de cytotoxicité est présente dans une multitude de maladies liées au vieillissement telles que le cancer, l'ostéoarthrite, l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires (101). Toutefois, le nombre de NK circulant est plus élevé chez les personnes plus âgées comparativement aux personnes plus jeunes (100) ce qui suggère une tentative de compensation de l'organisme à ce niveau. Les macrophages semblent aussi suivre la tendance négative engendrée par le vieillissement en voyant leurs capacités anti-bactériennes et leur présentation d'antigènes fortement diminuées (102, 103).

3.4.2 Évasion immunitaire

Une seconde explication de l'accumulation des cellules sénescents au fil des années est la présence de cellules sénescents ayant des caractéristiques particulières. Une des causes menant à l'évasion immunitaire est la diminution de la présentation d'antigènes à la membrane cellulaire telles que les antigènes des leucocytes humains (HLA) (104). Cela peut passer par divers mécanismes affectant la présentation d'antigènes en général tels que la diminution d'efficacité des tapasines (105), des transporteurs associés à la présentation antigénique (TAP) (106) et des protéines membranaires latentes du protéasome (LMP-2,-7) (107). Ceci leur permet de ne pas être détectées par les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs).

Les cellules voulant échapper au système immunitaire peuvent aussi utiliser la sécrétion de certains facteurs pour arriver à leurs fins. Ainsi, elles peuvent favoriser une réponse des lymphocytes T régulateurs (Treg) au détriment d'une réponse inflammatoire mettant en jeu les lymphocytes T effecteurs (Teff). Les Treg sont attirés dans le microenvironnement tumoral via la sécrétion de CCL22 et inhibent la réponse immunitaire (108). La sécrétion d'IL-10, de TGF- β et de VEGF est aussi utilisée pour favoriser une réponse de type Th2 (109). L'attraction de TAMs produisant ces cytokines anti-inflammatoires (110) ainsi que de cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes (MDSCs) permet de former un environnement immunosuppressif (111). En

plus de sécréter des protéines anti-inflammatoires, les cellules ne souhaitant pas se faire remarquer par les cellules immunitaires peuvent exprimer des molécules inhibitrices à leur surface. Un intérêt particulier a été porté récemment au ligand de mort programmée 1 (PDL-1) présent sur les cellules tumorales et interagissant avec son récepteur PD-1 situé sur les lymphocytes T (112).

Enfin, il a été démontré que certaines cellules tumorales peuvent remodeler le microenvironnement stromal afin de lui donner une structure semblable à celle des tissus lymphoïdes. Cette astuce permet aux cellules tumorales d'être protégées puisque la structure ainsi produite attire et maintient une activité des Treg qui assurent une protection contre l'effet cytotoxique des cellules immunitaires cytotoxiques (113, 114).

Prémisse

La sénescence cellulaire est un processus biologique ayant des effets bénéfiques ou néfastes pour l'organisme selon les contextes. Ces effets sont dus non seulement aux interactions directes entre les cellules sénescents et leur microenvironnement, mais aussi au phénotype sécrétoire développé par les cellules sénescents (SASP). Le SASP est une composante de la sénescence qui intéresse de plus en plus la communauté scientifique de par ses multiples effets parfois antagonistes entre eux. Compte tenu de l'impact important que peut avoir l'accumulation des cellules sénescents sur l'organisme dans un contexte de cancer tout comme dans un contexte de vieillissement, il est pertinent de s'intéresser au processus d'élimination de ces dernières. L'identification des composantes du SASP et des autres éléments tels que les ligands de surface régulant ce mécanisme est primordiale et permettra non seulement de comprendre comment les cellules sénescents sont spécifiquement reconnues par les cellules immunitaires, mais aussi avec quels acteurs cellulaires elles interagissent. Il sera ensuite plus facile de comprendre ce qui fait défaut aux cellules sénescents qui persistent en réussissant à passer outre le processus de surveillance immunitaire. Les macrophages, capables de moduler la réponse inflammatoire, sont de bonnes cibles pour essayer de favoriser la reconnaissance des cellules sénescents. C'est pourquoi nous avons porté un intérêt particulier à l'influence du SASP sur les activités biologiques des macrophages.

Hypothèse et objectifs

Notre hypothèse est que les cellules sénescents sont capables d'activer les macrophages via les différentes protéines contenues dans le SASP, tel que CCL-2, qui ont un effet direct sur la biologie des macrophages. Ces derniers pourront par la suite agir en tant que maîtres d'orchestre et recruter les autres acteurs immunitaires importants pour l'élimination directe des cellules sénescents. Cette élimination directe se ferait soit par les cellules NK ou les cellules T CD8⁺ ayant un pouvoir de lyse cytotoxique. Les macrophages en contact avec les cellules sénescents seraient donc pro-inflammatoires afin d'engendrer l'activation et le recrutement des autres cellules immunitaires impliquées dans ce processus.

Afin de tester notre hypothèse, nous avons deux objectifs majeurs qui sont :

- 1) Étudier l'activation des macrophages suite à une exposition au SASP.
- 2) Identifier les acteurs spécifiques qui sont responsables de l'élimination des cellules sénescents.

RÉSULTATS - Article

Title page

Senescent cell secretome modulate the inflammatory response orchestrated by macrophages in humans

Short title --- Crosstalk between macrophages and senescent cells

Authors -- Mireille Dessureault¹, David Possamai¹, Juliette Martin¹, Nicolas Malaquin¹, Fiona Wong¹, Guillaume B. Cardin¹, Réjean Lapointe^{1,2}, Jean-François Cailhier^{1,2,*}, Francis Rodier^{1,3,*,#}

¹ CRCHUM et Institut du cancer de Montréal, Montreal, QC, Canada

² Université de Montréal, Département de médecine, Montreal, QC, Canada

³ Université de Montréal, Département de Radiologie, Radio-Oncologie et Médecine Nucléaire, Montreal, QC, Canada

* These authors contributed equally

Corresponding author:

Francis Rodier, PhD

CRCHUM Pavillon R, R10-420

900 Rue St-Denis

Montreal, QC, H2X 0A9, Canada.

Phone: 1 (514) 890 8000 ext :26939

Key words: Age-associated diseases, cancer, CD4+ T cells, CD8+ T cells, inflammation, macrophages, senescence, immune surveillance, natural killer cells, SASP, senescent cell clearance, senescence-messaging secretome.

Authors contributions :

Mireille Dessureault planned, performed and analyzed most experiments, and was in charge of manuscript redaction under the supervision of Francis Rodier and Jean-François Cailhier.

David Possamaï performed and analyzed flow cytometry experiments and analysis.

Juliette Martin analyzed mobility assays and differentiation assays.

Nicolas Malaquin participated to multiplex antibody array experiments and infected BJ-U cells with the H2B-GFP lentivirus.

Fiona Wong established culture conditions for ThP1 cells and optimized PMA differentiation and CD11c antibody.

Guillaume B. Cardin created the H2B-GFP virus and helped perform multiplex antibody array experiments.

Réjean Lapointe supervised immunology experiments.

Jean-François Cailhier supervised the project, formulated research hypotheses and participated in correction of the manuscript.

Francis Rodier supervised the project, formulated research hypotheses and participated in writing the manuscript.

Abstract

Senescent cell clearance brings into play the senescence-associated secretory phenotype (SASP) and immune cells from the innate and adaptive immunity including macrophages (M ϕ). In this study, we report that the SASP has a pleiotropic effect on immune cell activity including recruitment, activation and differentiation. We show that human M ϕ exposed to the SASP of human fibroblasts develop a SASP-specific inflammatory profile characterized by pro-inflammatory (M1) secretion (e.g. IL-1 β , GM-CSF) and anti-inflammatory (M2) surface markers (CD23 and CD206). The SASP also increases M ϕ invasion but has no effect on monocyte differentiation. Co-culture models show that while NK cells are likely the direct effectors of senescent cell specific killing, their activity is modulated by other immune cells including M ϕ , which reduce NK-mediated killing, suggesting a M2 profile. Alternatively, CD8⁺ T lymphocytes were essential for senescent cell killing by NK cells. Finally, CD4⁺ T cells cultured for 48h in the SASP secreted high-levels of IL-4, indicating a Th2 polarization. Overall, our data reveal that the SASP can modulate M ϕ and other immune cells involved in senescent cell clearance and surprisingly promote an immunosuppressive response that could be important in tissue repair.

Word count: 188

Introduction

Cellular senescence is an essential tumor suppressor mechanism that prevents the proliferation of damaged cells following exposure to potentially oncogenic genotoxic stresses such as ionizing radiation (IR), oxidative stress or oncogene activation (1). Senescent cells display multiple functional hallmarks including a senescence-associated (SA) growth arrest (SAGA), morphological alterations and a senescence-associated secretory phenotype (SASP) responsible for senescent cell crosstalk with their microenvironment (1). Among others, the SASP contains interleukines, chemokines, growth factors and proteases, which have the potential to alter immune cell activity as well as other processes, sometimes in a context-dependent manner (2). For example, IL-6 and CXCL8 reinforce the SAGA (3, 4) but also promote cancer progression (5, 6). More generally, the SASP can be beneficial when it acts to promote efficient tissue repair (7), the recruitment of immune cells involved in senescent cell clearance (8) and limb patterning during embryogenesis (9, 10). Alternatively, the SASP can be detrimental when it contributes to cancer progression (11, 12) and modifies tissue microenvironment in a way that makes it contribute to age-associated organ dysfunctions (13, 14). These antagonistic effects of the SASP on the organism could be explained by the duration of the senescence response in tissues: the presence of transient senescent cells rapidly eliminated after their contribution to tissue protection/remodeling would be beneficial, while the presence of persistent senescent cells would have harmful consequences. In order to prevent cases where the senescence response persists, it is essential to understand how and by whom senescent cells get killed, keeping in mind that they are resistant to apoptosis (15-18). Senescent cells are capable to communicate with immune cells through secretion of cytokines and chemokines (e.g. CCL-2), expression of surface ligands (e.g. NKG2DL) (19) and protein exchanges via cytoplasmic bridges (CB) (20). The immune cells leading senescent cell clearance are still ill-defined, but evidence points to innate immune cells such as NK cells, neutrophils, dendritic cells (DC), monocytes/macrophages (M ϕ) and adaptive immune cells like CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes (8, 21-23). NK cells infiltrating and accumulating in senescent tissues are thought to be responsible for the direct killing of senescent cells (8, 21, 23), with preferential perforin and granzyme-mediated killing towards senescent cells expressing NKG2D ligands (19, 24). In tissues, NK cell activity is probably additionally regulated via their interactions with immune modulating cells such as macrophages, which also

tend to infiltrate senescent tissues and accumulate near senescent cells (8, 21-23). In fact, macrophage depletion can impact the immune surveillance of senescent tissues (21-23). Macrophages can be pro-inflammatory (M1) or anti-inflammatory (M2) depending on the activation signals they encounter and are able to switch from one phenotype to an other depending on the signals they receive from their environment (25, 26). M1 macrophages are associated with IL-1 β , TNF- α , CCL-2 secretion and CD80/86 expression, and are often associated with tumor regression and tissue damage (27). Previous observations have found that a M1 profile could be induced by senescent cells (28). On the other hand, M2 macrophages secrete TGF- β , IL-10 and express CD163, CD206 (the mannose receptor), are immunosuppressive and involved in inflammation repression during tissue repair, but also sometime participate in tumor progression (27).

Considering the central role that macrophages play in the immune response, we used human cells to further define the crosstalk between the SASP and immune cells, particularly focusing on macrophage activation. Looking at the different actors (NK cells, T lymphocytes) potentially implicated in senescence cell clearance, we demonstrate that SASP-activated macrophages have a mixed profile characterized by secretion of proteins associated with a M1 profile and expression of M2 surface markers. Furthermore, we confirm that human NK cells are responsible for the direct killing of senescent cells and reveal that macrophages and T cells are capable of modulating the effectiveness of this process.

Material and methods

Cell culture and reagents

Foreskin-derived diploid normal human fibroblasts BJ-U H2B-GFP and HCA2-hTERT were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Wisent, Cat. # 319-005-CL) containing L-glutamine, sodium pyruvate and D-glucose (4,5 g/L) and supplemented with 8% (v/v) foetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Cat. # 12483-020) and 1% (v/v) penicillin-streptomycin (pen-strep) (Wisent, Cat. # 450-201-EL). HCA2-hTERT were previously described (29). Stable expression of H2B-GFP in BJ normal fibroblast (ATCC, Cat. # CRL-2522) was achieved using lentiviruses generated as described (30). Briefly, H2B-GFP coding sequence was cloned into a Gateway entry vector and transferred to a lentiviral destination vector (670-1 puromycin resistance) under the control of the CMV/TO promoter (30).

ThP1 cells, a human monocytic cell line derived from a patient suffering from an acute monocytic leukemia, were maintained in culture at a density of 0.5 to 1 million cells/mL in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640) containing 8% (v/v) FBS and 1% (v/v) pen-strep.

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) were isolated using differential density centrifugation. Briefly, whole peripheral blood was drawn by venipuncture from healthy donors having given their written consent and collected in EDTA tubes (BD Vacutainer®, Cat # 366643). Whole blood was diluted in DPBS in 50 mL centrifuge tubes and a 13 mL of Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Life Sciences, Cat. # 17-1440-03) was layered at the bottom of the tube before centrifugation for 30 minutes at 1500 rpm. PBMCs were then harvested, washed in 50 mL of Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X without calcium and magnesium (DPBS) (Invitrogen) and centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes for a total of three washes. Two other washes with DPBS 1X were done and PBMCs were counted and resuspended in the appropriate culture medium. When specific immune cell populations were needed, positive selection kits were used (Macrophages/monocytes CD14+ : EasySep™ Human CD14 Positive Selection Kit, StemCell™, Cat. # 18058) (T cell CD8+ : EasySep™ Human CD8 Positive Selection Kit, StemCell™, Cat. # 18053) (NK CD56+ : EasySep™ Human CD56 Positive Selection Kit, StemCell™, Cat. # 18055) following the manufacturer standard protocols..

Preparation of conditioned media (CM)

Pre-senescent (control) and senescent (SASP) CM were prepared as described (31). Briefly, cells were seeded in 75 cm² plastic vessels 2 days prior to irradiation with 10 Gy. Irradiated human fibroblasts were kept in culture for 9 days to allow development of senescence-associated hallmarks (29), during which time culture media was changed every other day. At day 9, cells were washed twice in PBS and refeed with serum free (SF) media (DMEM 1% (v/v) pen-strep) for 16h (overnight, O/N) before CM collection. Cells were counted following collection allowing normalization on a per cell basis and CM were immediately aliquoted and stored at -80°C. Control CM (pre-senescent) was obtained by seeding cells in 75cm² plastic vessels 2 days prior to the O/N incubation in SF medium.

CM from macrophages were also collected after an O/N incubation in SF medium. CM were collected and macrophages in each well that was collected were counted.

Direct co-culture

Target cells to be irradiated were seeded first on glass slides (Sigma, Cat. # C7182). Two days after seeding, cells were irradiated (10 Gy) and medium was changed every other day for 9 days while cells trigger senescence (target senescent cells). Target control cells are then seeded 2 days prior to co-culture initiation in similar slides. To initiate co-culture, immune cells resuspended in RPMI 1640 1% (v/v) FBS 1% (v/v) pen/strep are added on top of target cells. Conditions containing immune cells activated are supplemented with IL-2 (50 CU/mL), and anti-CD3 (30 ng/mL) (eBioscience®, Cat. # 14-0037-82).

Indirect co-culture

CD14⁺ monocytes were isolated from peripheral blood and cultured in RPMI 1640 containing 8% (v/v) of human autologous serum 1% (v/v) pen-strep for 3 to 5 days in order to allow their differentiation in macrophages. Non-adherent cells were washed away and adherent cells were activated for 24h in CM from senescent or control HCA2-hTERT supplemented with 8% (v/v) of autologous serum. Macrophages were also activated in DMEM 8% (v/v) autologous serum 1% (v/v) pen-strep alone or supplemented with either IL-4 (20 ng/mL) (PeproTech®, Cat. # 200-04) or LPS (1 µg/mL) (Sigma, Cat. # L3012). Following activation, macrophages were cultured in SF RPMI 1640 1% (v/v) pen-strep for 16h. CM were collected and macrophages in each well were counted.

Human CD4⁺ and CD8⁺ T cells were isolated from PBMCs using positive selection kits (CD8⁺ : EasySep™ Human CD8 Positive Selection Kit, StemCell™, Cat. # 18053) (CD4⁺ : EasySep™ Human CD4 Positive Selection Kit, StemCell™, Cat. # 18052). After isolation, T cells were incubated for 48h in the CM of senescent or control human fibroblasts. Then T cells were incubated in their culture medium supplemented with brefeldin A (5mg/mL) (eBioscience®, Cat. # 00-4506) for 16h. Their activation profile and polarization were assayed using flow cytometry.

Monocyte differentiation assays

To assess the effect of the SASP on monocyte differentiation, ThP1 cells were seeded at 70,000 cells per well (8 well slide) or at 32,000 cells per well (96 well plate) in DMEM or HCA2-hTERT CM (SEN or Ctrl) containing 8% (v/v) FBS and 160 nM PMA. The cells were incubated for 3 days in these conditions before being fixed, stained with the differentiation marker CD11c, specific for Mφ, as described in the section Immunofluorescence and analyzed. CD11c mean fluorescence intensity (MFI) was assessed by taking 3 pictures in each well constituting technical replicates and then measuring the MFI of CD11c with ImageJ. Considering that macrophages adhere to cell culture dishes and monocytes do not, we also measured adherence after differentiation through a DNA fluorescent dye (DRAQ5™). Cells were incubated for 2h at RT in a mixture of 1:5000 (DRAQ5™ in PBS 1X). Fluorescence intensity at 700 nm was measured with the LI-COR®.

Mobility assay

ThP1 cells were seeded in RPMI 1640 containing 8% (v/v) FBS and 160 nM of Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) in a 24 well plate (200,000 cells per well). Two days after seeding, ThP1 cultures were transferred to an IncuCyte® Zoom microscope-incubator and pictures were taken every 2h in order to monitor mobility. Three days after initial seeding, the cells were put in the conditioned media of HCA2 hTERT (SEN or Ctrl) and kept in the IncuCyte® for another 4 days. Pictures were analyzed using ImageJ MTrackJ plugin.

Invasion assays

ThP1 cells were seeded 36h before starting invasion assays in 24 well plate invasion chambers with 8.0 microns pores coated with Matrigel® (Corning®, Cat. # 354480) in RPMI 1640 8% (v/v) FBS 1% (v/v) pen/strep containing 160 nM PMA (Sigma, Cat. # 79346). To initiate invasion assays, serum free RPMI 1640 1% (v/v) pen/strep containing 10% (v/v) of SF chemoattracting media was added to the lower chamber and SF RPMI 1640 1% (v/v) pen/strep

was added to the upper chamber. After 36h, invasion chambers were washed in DPBS 1X, the top of the membrane was scrapped and the cells on the other side of the membrane were fixed for 10 minutes in formalin 10% (w/v) (Sigma-Aldrich) before being washed again 3 times in PBS 1X. A fluorescent nuclear labeling using Hoechst 33342 (1:10000 in PBS 1X), for 5 minutes at room temperature (RT) (Invitrogen, Cat. # A10027), was done followed by 3 washes in PBS 1X. Membranes were cut and mounted on glass slides using ProLong® Diamond antifade mountant (Life Technologies™, Cat. # P36961). Nine pictures were taken to get a mean and a standard deviation following ImageJ analysis.

Immunofluorescence

Following the indicated periods of culture, non-adherent cells are washed away and adherent cells were fixed in formalin 10% (w/v) (Sigma-Aldrich) for 10 minutes at RT. Cells are washed 3 times in DPBS 1X and then permeabilized using PBS 0.25% (v/v) Triton X-100 for 20 minutes. Cells were washed 3 times in PBS 1X. Fixed slides were then used for immunofluorescence (below) or directly mounted using ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (Life Technologies™, Cat. # P36931) or Vectashield HardSet Mounting Medium (Vector Laboratories, Cat. # H-1400). When immunofluorescence labeling was required, fixed slides were blocked in PBS 1X containing 1% (w/v) of Bovine Serum Albumin (BSA) (Jackson Immunoresearch, Cat. # 001-000-161) and 4% (v/v) of donkey serum (Sigma, Cat. # D6993) for 1h. The primary antibody against surface marker CD11c (1:500 in blocking buffer) (Purified mouse anti-human CD11c, clone B-ly6, BD Pharmingen™, Cat. # 555391) specific to macrophages, was added O/N at 4°C or 3h at RT. Slides were washed the next morning with PBS 1X 0.05% (v/v) Tween®20 before being incubated at RT for 1 hour with a secondary antibody (anti-mouse, Alexa fluor 647 (Invitrogen). Slides were washed before mounting as described above. Slides were scanned using an Olympus BX61VS slides scanner and images analyzed using ImageJ.

Flow cytometry

Cells were washed with DPBS 1X and centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes before being resuspended in a blocking buffer constituted of human IgG (Jackson Immunoresearch, Cat. # 009-000-002) in DPBS at a final concentration of 0.2 mg/mL and incubated on ice for 10 minutes. A mix of fluorochrome-conjugated antibodies directed against surface antigens was then added and cells were incubated on ice for 20 minutes. Cells were washed twice with a buffer

containing 0.5% (w/v) BSA and 0.1% (w/v) sodium azide and analyzed. For T cells polarization experiments, cells were incubated in their culture medium supplemented with brefeldin A (5mg/mL) (eBioscience®, Cat. # 00-4506) for 16h, then cells were stained for surface antigens. Following the last wash, T cells were fixed and permeabilized with FoxP3 Fix/Perm Buffer (eBioscience®, Cat. # 00-5523-00) for 30 minutes at RT. Then cells were washed twice with a permeabilization buffer 1X (eBioscience®, Cat. # 00-8333-56) and incubated with a mix of fluorochrome-conjugated antibodies directed against intracellular antigens was then added and cells were incubated at RT for 30 minutes protected from light. Finally cells were washed twice with permeabilization buffer. All flow cytometry experiments were performed on a BD LSRFortessa™ analyzer and data were analyzed using FlowJo v10. All antibodies were purchased from BD Biosciences: CD3-Alexa Fluor 700 (UCHT1), CD4-BUV395 (RPA-T4), CD8-Pacific Blue (RPA-T8), CD14-APC (M5E2), CD16-PE-CF594 (3G8), CD56-FITC (NCAM16.2), Granzyme B-V421 (GB11), IFN- γ -PE-CF594 (B27), IL-4-APC (8D4-8), IL-17A-BV786 (N49-653), CD8-APC-H7 (SK1).

Multiplex antibody array and ELISA

Between 50 and 100 μ L of CM prepared as previously described was used for IL-6 ELISA (R&D systems®, Cat. # S6050). Protocols provided by the manufacturer were followed. Absorbency was measured at 450 nm with VersaMax™ microplate reader (Molecular Devices) and correction at 540 nm was done.

Multiplex antibody array experiments were performed using the V-PLEX Plus Human Biomarker 40-Plex Kit following manufacturer protocol (Meso Scale Discovery®, Cat. # K15209G-1). Data collection was obtained on a MESO QuickPlex SQ 120. Data analysis was made using Excel. Concentration of each protein was calculated and values that were too low or too high were replaced by the limits of detection. Conditional formatting was then performed to illustrate our data.

Statistical Methods

All quantitative data are expressed as means \pm standard deviation. Data were compared using a t-test and P values < 0.05 were considered as statistically significant.

Results

The SASP impacts monocyte and macrophage behaviors

The SASP generally contains a plethora of pro-inflammatory factors such as CXCL-8 and IL-6 that can potentially influence immune cells biology (2). We first confirmed that the SASP of HCA2-hTERT cells matched the predicted pro-inflammatory profile using a multiplex antibody array that quantitatively measures the concentration of 40 different proteins (cytokines, chemokines, etc.). As expected, the CM of non-irradiated (Ctrl) or irradiated senescent (SEN) HCA2-hTERT displayed major differences with marked increases in many angiogenesis and inflammation regulating proteins including CXCL8 (IL-8), CCL2 (MCP-1), IL-6, ICAM-1 and VEGFR-1 (Figure 1A).

While a multitude of SASP components such as those illustrated above have been identified, their effect on immune cells has not been assessed yet. Using the CM analyzed in Figure 1B, we performed a series of functional assays to determine the influence of the SASP on ThP1 monocyte and ThP1 macrophage behaviors (experimental flowchart summarized in Figure 1B). We first looked the effect of the SASP on monocyte maturation by looking at the level of cell adhesion, because only M ϕ will adhere to plastic, and the level of CD11c expression, a marker specific for M ϕ . In order to do that, we used the ThP1 monocyte maturation model (32, 33). We noted no significant differences in adherence or in the expression of the differentiation marker CD11c between exposures to senescent or control CM (Figure 1C). However, the use of both CM apparently decreased the expression of CD11c, suggesting that fibroblast CM in general interfere with the complete maturation of ThP1 monocytes into macrophages using this model. We next evaluated macrophage invasion ability using Boyden chamber and ThP1 macrophages in contact with the SASP invaded significantly more rapidly when compared to control CM (Figure 1D). Alternatively, exposure to the SASP did not appear to alter individual ThP1 macrophage mobility when cell travel was measured on a 2D surface (Figure 1E). Together, these data suggest that the SASP at least impacts ThP1 monocyte and ThP1 macrophage behaviors associated with their recruitment (invasion) during inflammation.

Macrophages can be reprogrammed to develop a SASP-specific inflammatory profile

To potentially mimic the initial encounter between a senescent cell and a monocyte/macrophage, we next analyzed the inflammatory profile of macrophages themselves following an exposure to the SASP (experimental flowchart summarized in Figure 2A). Differentiated macrophages

derived from circulating monocytes were exposed to the CM of fibroblasts for 24h before having their own CM analyzed (Figure 2B). Macrophages cultured for 24h in the CM of control (Ctrl) and senescent (SEN) HCA2-hTERT both secrete proteins associated with an inflammatory profile resembling the profile induced by LPS, a TLR-4 ligand leading to the induction of an M1 phenotype (Figure 2B) (34). However, the CM of macrophages activated in the SASP contains much higher levels of inflammatory proteins such as IL-6, CXCL10, GM-CSF, IL-1 β and CXCL8, when compared to cells exposed to Ctrl CM (Figure 2C). In order to confirm that macrophages develop a clear inflammatory profile following exposure to the SASP, we next looked at typical surface markers known to be expressed either by M1 or M2 macrophages. Looking at cells expressing both CD23 and CD206, which are typical M2 markers, the data show a clear increase of the M2 population when macrophages are activated by the SASP (Figure 2D). Alternatively, the mean fluorescence intensity (MFI) of the M1 markers CD80 and CD86 does not show any significant increase following exposure to the SASP (Figure 2D). Collectively, these data indicate that SASP-activated macrophages secrete proteins associated with a pro-inflammatory profile but tend to express anti-inflammatory surface markers.

Given that the SASP can program naïve macrophages and push them towards an apparently mixed SASP-specific M1/M2 profile, we also wanted to investigate whether macrophages phenotypic plasticity allowed the SASP to influence macrophages that were already engaged in a prototypical M1 phenotype. We thus activated macrophages for 24h with LPS and then changed the culture media for one containing the CM of senescent or control fibroblasts for another 24h. IL-6 levels secreted by these previously activated macrophages revealed that these macrophages can be reprogrammed to loose the strong M1 pro-inflammatory profile induced by LPS when they were incubated with the control CM. However, macrophages that were first activated by LPS and then further reprogrammed by the SASP showed enhanced IL-6 secretion when compared to LPS activation alone (Figure 2E). This suggests that the SASP is capable of not only programming macrophages, but can also reprogram macrophages that have already activated a particular inflammatory profile.

The SASP can polarize T cells

Considering the fact that senescent cell clearance is a complex process that must involve a cascade of interactions between different types of immune cells, we evaluated the effect of the SASP on T cells, which have been reported to participate in immune surveillance of senescent

cells (23). Following an incubation of 48h in the CM of either senescent or control human fibroblasts, human CD4⁺ T cells showed a bias towards Th2 polarization, with a particularly strong increase in IL-4 production in SASP-activated CD4⁺ T cells (Figure 2F). Consistent with a polarization towards regulatory functions, only a small increase in granzyme B producing CD4⁺ T cells having cytotoxic capacities (ThCTL) was observed (35, 36) (Figure 2F). Alternatively, CD8⁺ T cells displayed moderate increases in granzyme B and IL-4, particularly when SASP exposed.

Activated NK cells specifically kill senescent cells

Previous studies have already shed some light on the interactions between senescent and immune cells during senescent cell clearance by the immune system, but the great majority have so far been restricted to the use of mice models or immortalized cell lines. We thus evaluated the roles of different immune cell compartments during human normal senescent cell clearance. To test this, we elaborated a direct co-culture model where human fibroblasts (BJ-U H2B-GFP) are seeded first and then immune cells (activated with IL-2 and anti-CD3, or not) are added later to the cell culture dish. Assessment of cell viability is made through the count of H2B-GFP labeled cells left in the different wells after selected periods of co-culture (Figure 3A). As many previous studies have proposed that NK cells play an important role in the direct killing of senescent cells, we first isolated human NK cells to confirm that this immune compartment is important during human normal senescent cell clearance. Interestingly, activated NK cells that encountered human fibroblasts were able to kill their targets in a ratio-dependent manner, with NK cells in a ratio of 1:1 (effector:target) unable to preferentially kill their senescent cells targets, while NK cells used in a ratio of 10:1 could efficiently, and preferentially, kill senescent cells (Figure 3B). While these results confirm previously obtained NK-mediated specific senescent cell killing seen in mice models and cell lines, they also suggest that multiple NK cells are required to kill a single senescent human fibroblast. We then looked at the effect of NK cell depletion in a PBMC killing assay. In this case, activated NK-depleted PBMC populations (NK-) showed diminished killing abilities compared to the activated PBMCs containing NK cells (Figure 3B). Perhaps not surprisingly, this suggests that human NK cells play a major role in normal human senescent cell killing. What is surprising here is the fact that this condition was the only one where specificity could be seen. Indeed, when we first put PBMCs on top of our target cells, we realized that, not only immune cells needed to be activated with IL-2 and anti-CD3 in order to see cell clearance,

but also immune cells were killing both Ctrl and SEN cells (Figure 3C). Considering that our co-culture model is heterologous, containing target and effector cells from two different donors, this non-specificity is not that astonishing. However, even in a heterologous model, NK cells are capable of preferentially targeting SEN cells.

CD8⁺ T cells are essential for NK-mediated killing of senescent cells

Alongside NK cells, cytotoxic T lymphocytes are also capable of killing cells that could endanger the organism, sometime in a T-cell receptor non-specific manner (37). Thus, we investigated whether in our model CD8⁺ T cells could play a role in PBMC-mediated senescent cell killing. First, we isolated circulating CD8⁺ T cells and used them in a ratio of 1:1 and 10:1 (effector:target) to verify whether the killing capabilities of these cells mimicked those of NK cells. In contrast to NK cells, CD8⁺ T cells alone are incapable to directly kill control or senescent human fibroblast, no matter the effector to target ratio (Figure 3D). Nonetheless, activated CD8-depleted population (CD8-) completely lost their ability to kill human fibroblasts (Figure 3D), suggesting that CD8⁺ T cells are not responsible for the direct killing of senescent cells, but that their presence is necessary for NK-mediated killing.

Macrophages restrain NK-mediated killing of senescent cells

We have previously defined that senescent cells can reprogram macrophages to an apparently SASP-specific mixed M1/M2 polarization. We thus wondered how macrophages contribute to PBMC-mediated senescent cell killing. First, isolated macrophages generated from CD14⁺ blood-derived monocytes were incapable of directly killing control or senescent human fibroblasts. However, IL-2/anti-CD3 activated CD14-depleted PBMC population (CD14-) showed enhanced killing towards both control and senescent target cells (Figure 3E), indicating that macrophages perhaps behave in a M2 manner, restraining NK-mediated killing in this context.

Discussion

In this study, we looked at the interactions existing between senescent cells and immune cells, focusing on macrophages because of their central role in inflammation. To explore this question, we used a model of normal human fibroblasts, which have a well-characterized cellular senescence response, in combination with normal human immune cells isolated from human peripheral blood.

The secretome of senescent cells, the SASP, has been proposed as a mean of communication between senescent cells and immune cells (8, 21). Looking at different proteins contained in the SASP of HCA2-hTERT cells, an immortalized normal human fibroblast cell line, we validated SASP factors, some upregulated up to a 1000 fold compared to control cells, many with functions related to the immune system. For example, CXCL8, the protein showing the highest upregulation in HCA2-hTERT SASP, is a chemokine mostly known for its capacity to activate and recruit neutrophils (38). CCL2, also known as monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), is increased over a 100 times in the SASP and it can have a direct impact on monocyte recruitment and thus replenish macrophages population in the inflammatory microenvironment (39). GM-CSF, or Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, is a protein with important consequences on macrophage biology and is highly present in the SASP. All of these evidences put forward the importance of the SASP when it comes to regulating immune cells in order to induce senescent cell clearance.

Macrophages are an essential part of the inflammatory response. They are among the first cells present at the inflammation site and they modulate the activity and functions of other immune cells (40, 41). Our results show that human macrophages are potentially reprogrammed by the SASP of human fibroblasts and develop an inflammatory profile featuring both M1 and M2 polarization markers. While SASP-reprogrammed macrophage secreted increased levels of many pro-inflammatory proteins, suggesting a M1 profile, the same SASP-reprogrammed cells combine cell surface markers, CD23 and CD206, whose expression is normally associated with an anti-inflammatory M2 profile. We hypothesize that macrophages can develop a SASP-specific inflammatory profile that would combine elements from M1 and M2 profiles. In addition, our data show that the SASP not only program naïve monocytes, but can also exploit macrophage phenotypic plasticity to reprogram previously polarized macrophages.

SASP-activated ThP1 macrophages show increased invasion but their mobility is not affected by the SASP. These macrophages, once activated and recruited by the SASP, can probably have an effect on other immune cells. In theory, this SASP-mediated programming/reprogramming could contribute to a chain reaction leading to the recruitment and activation of other immune cells to the site of senescent cell accumulation. Macrophages plasticity in the context of SASP exposure could suggest that later on, during the process of senescent cell clearance, macrophages could switch from their SASP-specific M1 inflammatory profile to a M2 profile in order to put a stop to

the inflammatory response. This change in profile would help to prevent chronic inflammation and thus tissue damage during senescent cell clearance. This M2 profile was seen in our co-culture models where activated PBMCs depleted of monocytes, showed increased cytotoxic capacities toward fibroblasts. In that setting, all of the immune actors are already present at the inflammation site (as if they were recruited) meaning that macrophages are perhaps not needed to initiate this response via their SASP-specific M1 profile. The incapacity of macrophages to directly kill senescent cells was shown by putting isolated macrophages on fibroblasts, supporting the idea that other immune cells are responsible for senescent cell killing.

Considering that macrophage biology was impacted by the SASP, we also looked at the effect of the SASP on monocytes that can differentiate into macrophages once they reach the inflamed tissue. No change was seen in monocyte differentiation when it happens in presence of the SASP. This would suggest that the SASP can only impact macrophages and not undifferentiated monocytes. However, the SASP is capable of having an effect on other types of immune cells. Looking at CD4⁺ and CD8⁺ T cells, we were able to see an increase in Th2 polarized cells. Indeed, CD4⁺ T cells secreted large amounts of IL-4 after an incubation of 48h in the SASP. These findings regarding anti-inflammatory SASP-activated populations are in agreement with previously published papers potentially classifying senescence as an immunosuppressive mechanism (42). IL-6 secretion by senescent cells and SASP-activated macrophages is probably responsible for this Th2 polarization (43, 44). Interestingly, these results do not concur with previously described Th1 polarization of CD4⁺ T cells in the neighborhood of senescent cells, perhaps because previous results were obtained in mice using a different model system (23). Considering the differences existing between mice and humans immune systems, it is realistic that CD4⁺ T cells do not have the same roles depending on the species. Taken together, polarization data of immune cells using the SASP show strong anti-inflammatory properties of the SASP. This suggests that, in this model, senescent cells are capable of recruiting immune cells and then induce an anti-inflammatory polarization.

Senescent cell clearance can be orchestrated by macrophages, but we still needed to identify with certainty which type of immune cells were in charge of the direct killing or had an important role of collaboration and then could be impacted by SASP-activated macrophages. Keeping in mind what has already been described about NK cell functions and their probable interactions with senescent cells, we decided to isolate human NK cells and co-culture them along with with

human fibroblasts. Interestingly, NK cells, when used in a 10:1 (effector to target) ratio, were capable of killing specifically senescent cells. This result obtained with primary cell lines reproduces what has been shown by Krizhanovsky *et al.* using the YT NK cell line (8), with the only difference that primary NK cells needed to be activated with IL-2 in order to be capable of killing target cells. This could be explained by the fact that they used a cell line derived from a patient with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and that we used NK cells from healthy donors. Even when we used PBMCs that had not been depleted, we needed to activate them with IL-2 and anti-CD3 (necessary for T lymphocyte activation). The SASP of human normal senescent fibroblasts is probably not strong enough in this context to activate immune cells. However, the specificity of NK cells using the 10:1 ratio contrasted with the non-specificity of activated PBMCs which killed Ctrl and SEN cells indifferently. Considering that our co-culture model is heterologous, containing target and effector cells from two different donors, this non-specificity is not that astonishing. The specificity of NK cells nonetheless, even in a heterologous model, highlights the properties of NK cells to target only senescent cells. We also used the NK-depleted population of PBMCs to show that, in fact, this population had a diminished cytotoxic effect on fibroblasts. *In vivo* data would be necessary to conclude with confidence that NK cells are in charge of senescent cell direct killing, though *in vitro* evidences are convincing. This specificity of NK cells for senescent cells would need to be explored some more to explain the mechanisms underlying this process and permitting NK cells to draw the line between healthy and senescent cells. In this way, it would be possible to identify what secreted protein or surface molecule dictates senescence surveillance and could be modulated in order to promote senescent cell clearance.

The literature suggests a collaboration of different type of immune cells in the context of senescent cell clearance. Thus, we looked at CD8⁺ T cells which have a cytotoxic activity and could also be part of senescent cell direct killing. Using a blood-derived population of CD8⁺ T cells in different effector to target ratios, no killing by the CD8⁺ T cells alone was observed. Interestingly, the killing of senescent cells was completely abrogated when CD8⁺ T cells were depleted from the population of PBMCs. This result suggests that CTL are not in charge of the direct killing of senescent cells, but have an important role to play during this process, probably secreting proteins that would help and activate NK cells. This helper effect of CTL should be further investigated in order to assess the real importance of this type of immune cells in

senescent cell clearance. Isolation of other types of immune cells that are thought to have a role during this process should also be done to determine the network associated with senescent cell clearance.

Conclusion

It is now clear that macrophages play a limited role in the direct elimination of senescent cells. However, these cells can orchestrate the activity of other immune cells involved in this process by modulating, for example, NK-mediated killing. While it was somehow predictable that macrophages could orchestrate the initiation of the complex immune response to senescent cells, our results now suggest that these important cells are also involved in tuning down senescence-associated inflammation. A better understanding of senescent cell clearance could lead to the development of therapies centered around the manipulation of macrophage responses to the SASP. This would allow us to promote an ordered resolution of tissue damage in diseases associated with aging and leading to inflammation.

Acknowledgements

We thank members of the Rodier, Cailhier and Lapointe laboratory for valuable comments and discussions. We also thank the members of the Molecular Pathology platform at the CRCHUM who performed the scanning co-culture slides: Véronique Barrès, Christine Caron, Liliane Meunier and Gabriela Frago. This work was supported by the Institut du cancer de Montréal and by grants from the Canadian Institute for Health Research [MOP114962] and the Terry Fox Research Institute [1030] to FR. FR is supported by the Fonds de Recherche Québec Santé junior I career award [22624]. MD is supported by the Master traineeship award program of the Fonds de Recherche Québec Santé.

References

1. Rodier, F., and J. Campisi. 2011. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 192: 547-556.
2. Coppe, J. P., P. Y. Desprez, A. Krtolica, and J. Campisi. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5: 99-118.
3. Acosta, J. C., A. O'Loughlen, A. Banito, M. V. Guijarro, A. Augert, S. Raguz, M. Fumagalli, M. Da Costa, C. Brown, N. Popov, Y. Takatsu, J. Melamed, F. d'Adda di Fagagna, D. Bernard, E. Hernando, and J. Gil. 2008. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* 133: 1006-1018.
4. Kuilman, T., C. Michaloglou, L. C. Vredeveld, S. Douma, R. van Doorn, C. J. Desmet, L. A. Aarden, W. J. Mooi, and D. S. Peeper. 2008. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 133: 1019-1031.
5. Sparmann, A., and D. Bar-Sagi. 2004. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* 6: 447-458.
6. Tamm, I., T. Kikuchi, I. Cardinale, and J. G. Krueger. 1994. Cell-adhesion-disrupting action of interleukin 6 in human ductal breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3329-3333.
7. Demaria, M., N. Ohtani, S. A. Youssef, F. Rodier, W. Toussaint, J. R. Mitchell, R. M. Laberge, J. Vijg, H. Van Steeg, M. E. Dolle, J. H. Hoeijmakers, A. de Bruin, E. Hara, and J. Campisi. 2014. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* 31: 722-733.
8. Krizhanovsky, V., M. Yon, R. A. Dickins, S. Hearn, J. Simon, C. Miething, H. Yee, L. Zender, and S. W. Lowe. 2008. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 134: 657-667.
9. Storer, M., A. Mas, A. Robert-Moreno, M. Pecoraro, M. C. Ortells, V. Di Giacomo, R. Yosef, N. Pilpel, V. Krizhanovsky, J. Sharpe, and W. M. Keyes. 2013. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155: 1119-1130.
10. Munoz-Espin, D., M. Canamero, A. Maraver, G. Gomez-Lopez, J. Contreras, S. Murillo-Cuesta, A. Rodriguez-Baeza, I. Varela-Nieto, J. Ruberte, M. Collado, and M. Serrano. 2013. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155: 1104-1118.
11. Liu, D., and P. J. Hornsby. 2007. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res* 67: 3117-3126.
12. Krtolica, A., S. Parrinello, S. Lockett, P. Y. Desprez, and J. Campisi. 2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12072-12077.
13. Baker, D. J., T. Wijshake, T. Tchkonja, N. K. LeBrasseur, B. G. Childs, B. van de Sluis, J. L. Kirkland, and J. M. van Deursen. 2011. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479: 232-236.
14. Baker, D. J., B. G. Childs, M. Durik, M. E. Wijers, C. J. Sieben, J. Zhong, R. A. Saltness, K. B. Jeganathan, G. C. Verzosa, A. Pezeshki, K. Khazaie, J. D. Miller, and J. M. van Deursen. 2016. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530: 184-189.

15. Rochette, P. J., and D. E. Brash. 2008. Progressive apoptosis resistance prior to senescence and control by the anti-apoptotic protein BCL-xL. *Mech Ageing Dev* 129: 207-214.
16. Jackson, J. G., and O. M. Pereira-Smith. 2006. p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts. *Cancer Res* 66: 8356-8360.
17. Wang, E. 1995. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res* 55: 2284-2292.
18. Ryu, S. J., Y. S. Oh, and S. C. Park. 2007. Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts. *Cell Death Differ* 14: 1020-1028.
19. Sagiv, A., D. G. Burton, Z. Moshayev, E. Vadai, F. Wensveen, S. Ben-Dor, O. Golani, B. Polic, and V. Krizhanovsky. 2016. NKG2D ligands mediate immunosurveillance of senescent cells. *Aging (Albany NY)* 8: 328-344.
20. Biran, A., M. Perelmutter, H. Gal, D. G. Burton, Y. Ovadya, E. Vadai, T. Geiger, and V. Krizhanovsky. 2015. Senescent cells communicate via intercellular protein transfer. *Genes Dev* 29: 791-802.
21. Xue, W., L. Zender, C. Miething, R. A. Dickins, E. Hernando, V. Krizhanovsky, C. Cordon-Cardo, and S. W. Lowe. 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445: 656-660.
22. Liu, Y., O. E. Hawkins, Y. Su, A. E. Vilgelm, T. Sobolik, Y. M. Thu, S. Kantrow, R. C. Splittgerber, S. Short, K. I. Amiri, J. A. Ecsedy, J. A. Sosman, M. C. Kelley, and A. Richmond. 2013. Targeting aurora kinases limits tumour growth through DNA damage-mediated senescence and blockade of NF-kappaB impairs this drug-induced senescence. *EMBO Mol Med* 5: 149-166.
23. Kang, T. W., T. Yevsa, N. Woller, L. Hoenicke, T. Wuestefeld, D. Dauch, A. Hohmeyer, M. Gereke, R. Rudalska, A. Potapova, M. Iken, M. Vucur, S. Weiss, M. Heikenwalder, S. Khan, J. Gil, D. Bruder, M. Manns, P. Schirmacher, F. Tacke, M. Ott, T. Luedde, T. Longerich, S. Kubicka, and L. Zender. 2011. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 479: 547-551.
24. Sagiv, A., A. Biran, M. Yon, J. Simon, S. W. Lowe, and V. Krizhanovsky. 2013. Granule exocytosis mediates immune surveillance of senescent cells. *Oncogene* 32: 1971-1977.
25. Saccani, A., T. Schioppa, C. Porta, S. K. Biswas, M. Nebuloni, L. Vago, B. Bottazzi, M. P. Colombo, A. Mantovani, and A. Sica. 2006. p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res* 66: 11432-11440.
26. Guiducci, C., A. P. Vicari, S. Sangaletti, G. Trinchieri, and M. P. Colombo. 2005. Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res* 65: 3437-3446.
27. Foey, A. D. 2014. Macrophage Polarisation: A collaboration of Differentiation, Activation and Pre-Programming? *J Clin Cell Immunol* 6: 293.
28. Lujambio, A., L. Akkari, J. Simon, D. Grace, D. F. Tschaharganeh, J. E. Bolden, Z. Zhao, V. Thapar, J. A. Joyce, V. Krizhanovsky, and S. W. Lowe. 2013. Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell* 153: 449-460.
29. Rodier, F., J. P. Coppe, C. K. Patil, W. A. Hoeijmakers, D. P. Munoz, S. R. Raza, A. Freund, E. Campeau, A. R. Davalos, and J. Campisi. 2009. Persistent DNA damage

- signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11: 973-979.
30. Campeau, E., V. E. Ruhl, F. Rodier, C. L. Smith, B. L. Rahmberg, J. O. Fuss, J. Campisi, P. Yaswen, P. K. Cooper, and P. D. Kaufman. 2009. A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One* 4: e6529.
 31. Rodier, F. 2013. Detection of the senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Methods Mol Biol* 965: 165-173.
 32. Daigneault, M., J. A. Preston, H. M. Marriott, M. K. Whyte, and D. H. Dockrell. 2010. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 5: e8668.
 33. Schwende, H., E. Fitzke, P. Ambs, and P. Dieter. 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol* 59: 555-561.
 34. Martinez, F. O., and S. Gordon. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6: 13.
 35. Marshall, N. B., and S. L. Swain. 2011. Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *J Biomed Biotechnol* 2011: 954602.
 36. Quezada, S. A., T. R. Simpson, K. S. Peggs, T. Merghoub, J. Vider, X. Fan, R. Blasberg, H. Yagita, P. Muranski, P. A. Antony, N. P. Restifo, and J. P. Allison. 2010. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med* 207: 637-650.
 37. von Geldern, M., B. Simm, M. Braun, E. H. Weiss, D. J. Schendel, and C. S. Falk. 2006. TCR-independent cytokine stimulation induces non-MHC-restricted T cell activity and is negatively regulated by HLA class I. *Eur J Immunol* 36: 2347-2358.
 38. de Oliveira, S., C. C. Reyes-Aldasoro, S. Candel, S. A. Renshaw, V. Mulero, and A. Calado. 2013. Cxcl8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. *J Immunol* 190: 4349-4359.
 39. Deshmane, S. L., S. Kremlev, S. Amini, and B. E. Sawaya. 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 29: 313-326.
 40. Zhou, Z., C. Zhang, J. Zhang, and Z. Tian. 2012. Macrophages help NK cells to attack tumor cells by stimulatory NKG2D ligand but protect themselves from NK killing by inhibitory ligand Qa-1. *PLoS One* 7: e36928.
 41. Cote, C. K., N. Van Rooijen, and S. L. Welkos. 2006. Roles of macrophages and neutrophils in the early host response to *Bacillus anthracis* spores in a mouse model of infection. *Infect Immun* 74: 469-480.
 42. Ruhland, M. K., A. J. Loza, A. H. Capietto, X. Luo, B. L. Knolhoff, K. C. Flanagan, B. A. Belt, E. Alspach, K. Leahy, J. Luo, A. Schaffer, J. R. Edwards, G. Longmore, R. Faccio, D. G. DeNardo, and S. A. Stewart. 2016. Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis. *Nat Commun* 7: 11762.
 43. Rincon, M., J. Anguita, T. Nakamura, E. Fikrig, and R. A. Flavell. 1997. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* 185: 461-469.
 44. Diehl, S., and M. Rincon. 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 39: 531-536.

Figure 1. Macrophages biological activity is influenced by the SASP

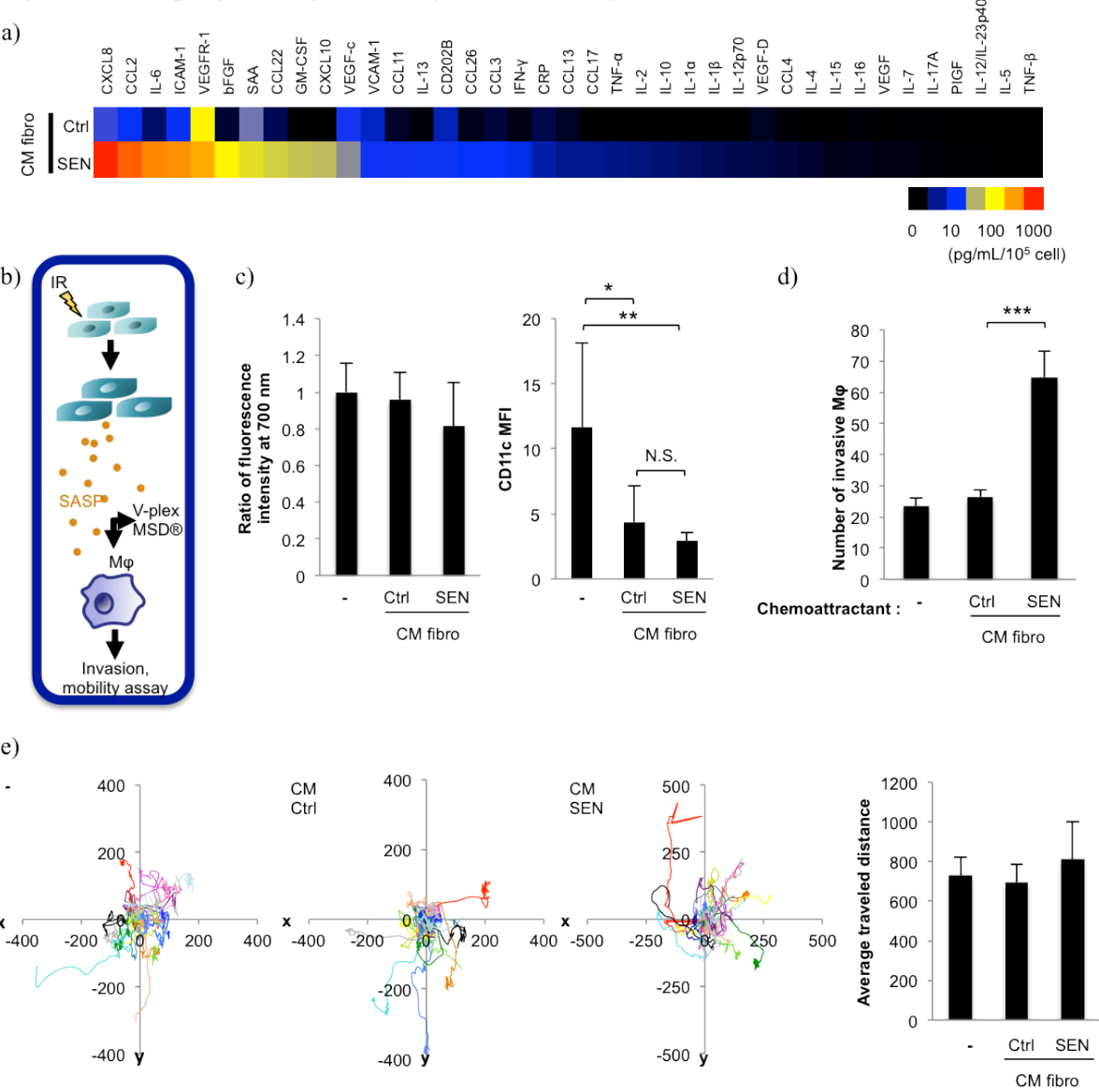


Figure 2. Macrophages and other immune cells are reprogrammed by the SASP

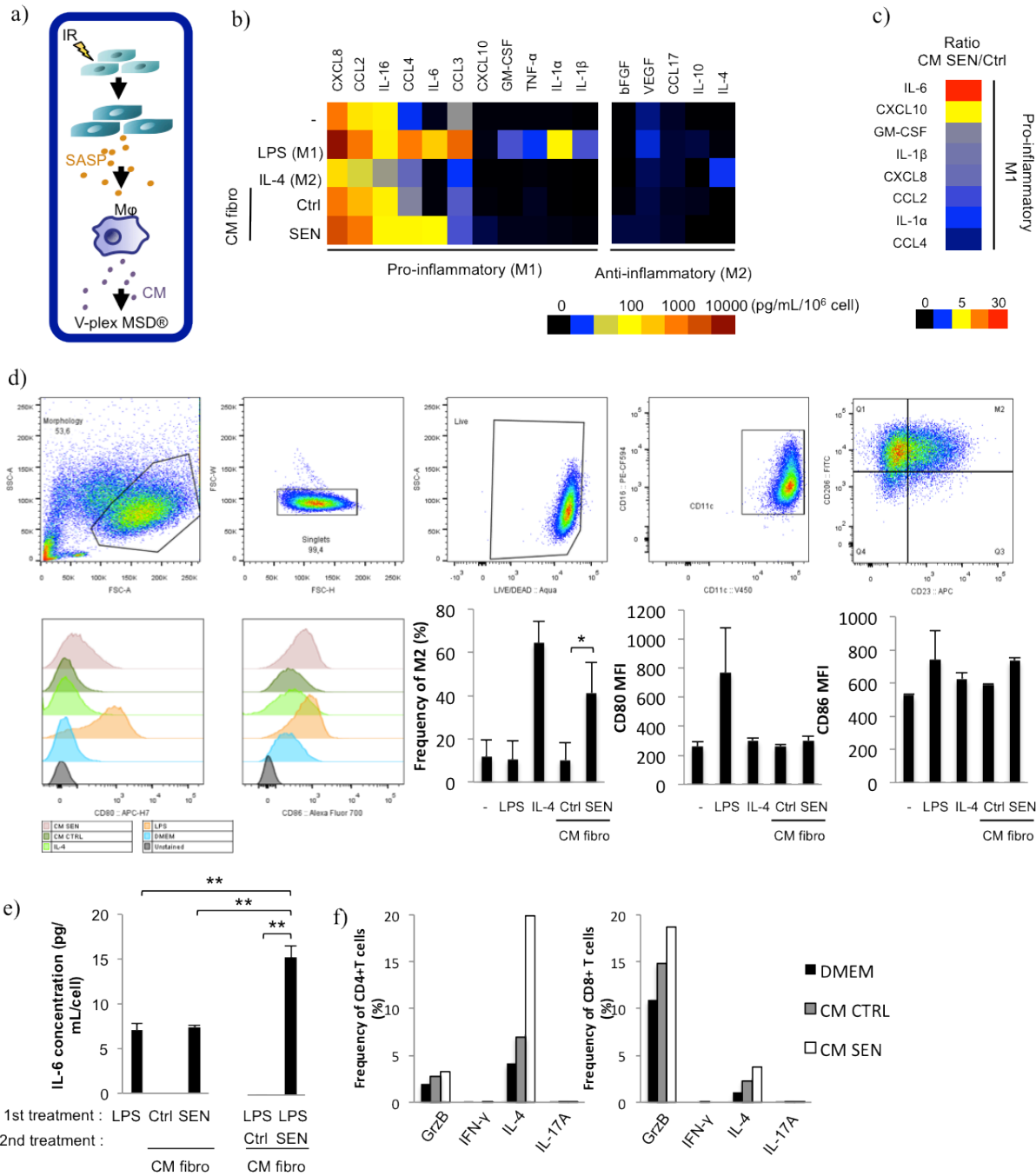


Figure 3. Immune cell populations and their role in senescent cell clearance

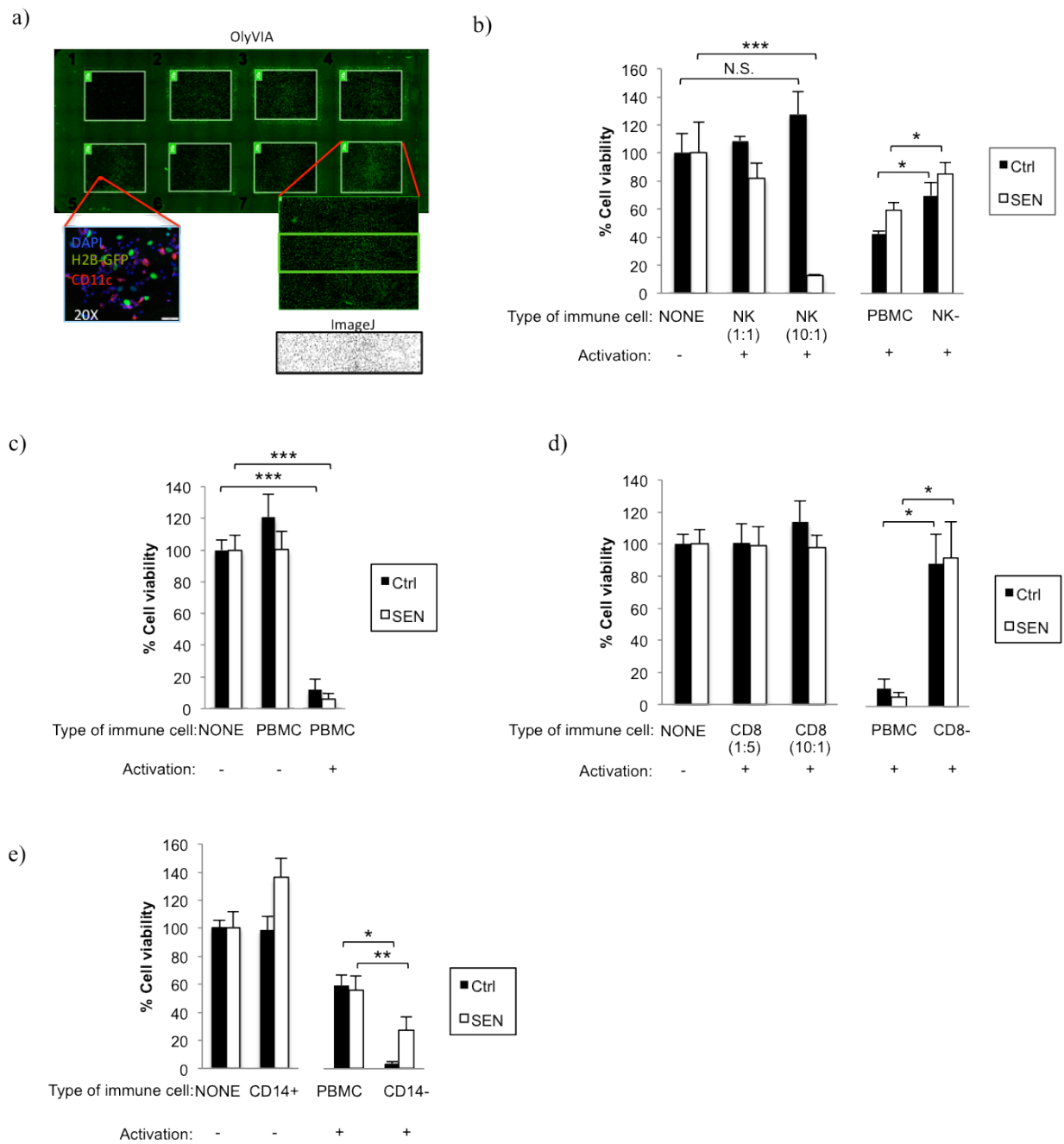


Figure and table legends:

Figure 1. Macrophages biological activity is influenced by the SASP. a) MSD® 40-plex multiplex assay using the conditioned media (CM) of control (Ctrl) fibroblasts and senescent (SEN) fibroblasts collected 9-10 days following irradiation. Data is normalized to cell number (reported as cell pg/mL/ 10^5 cells secreted over a 16h period) and black represents undetectable targets. One representative experiment is shown. (n=3) b) Flowchart of the experimental design highlighting the analyzed phenotypes. c) Maturation of ThP1 monocytes in Ctrl or SEN CM of fibroblasts. The cells were incubated for 3 days in CM before being stained with the differentiation marker CD11c, specific for M ϕ . CD11c mean fluorescence intensity (MFI) was measured with ImageJ. Adherence to plastic, a particularity of M ϕ , was measured through a DNA fluorescent dye (DRAQ5™). Fluorescence intensity at 700 nm was measured with the LI-COR®. Data are presented as means \pm STDEV. (n=2) d) Invasion assays of differentiated ThP1 cells (160 nM of PMA for 36h) exposed to the CM of Ctrl or SEN fibroblasts as a chemoattractant for 36h. Data are presented as means \pm STDEV. (n=1) e) Individual ThP1 macrophages mobility was measured over a period of 4 days in Ctrl or SEN CM. Live imaging pictures were taken every 2h and movement of 18 individual cells, showed on the left, is reported per condition. The average travel distance of each cell was calculated and is plotted in the bar graph on the right. Data are presented as means \pm STDEV. (n=1) Student t-test were performed. P values < 0.05 were considered as statistically significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

Figure 2. Macrophages and other immune cells are reprogrammed by the SASP. a) Flowchart of the experimental design highlighting the analyzed phenotypes during macrophages activation. b) MSD® 40-plex multiplex assay using the conditioned media (CM) of macrophages activated for 24h in the CM of Ctrl or SEN fibroblasts collected 9-10 days following irradiation. Selection of targets that are associated in the literature with a pro-inflammatory or an anti-inflammatory profile was made. Data is normalized to cell number (reported as cell pg/mL/ 10^6 cells secreted over a 16h period) and black represents undetectable targets. One representative experiment is shown. (n=3) c) Ratio of the secretion values obtained using multiplex assay for the activation in SEN CM divided by values observed in the Ctrl CM. Color scale represents ratio (from 0 to 30). One representative experiment is shown. (n=3) d) Flow cytometry analysis of macrophages

surface markers. CD14⁺ cells isolated from peripheral blood spent 3 days in RPMI 1640 containing 8% (v/v) autologous serum in order to induce their differentiation into macrophages. Macrophages were next activated for 24h in the CM of Ctrl or SEN fibroblasts before being collected. Gating strategy consisted of looking at morphology, singlets, live cells and cells expressing the macrophage marker CD11c. M2 macrophages were identified through their expression of both CD206 and CD23 and the frequency of M2 was calculated for each condition. Fluorescence intensity is shown for CD80 and CD86 with black curve representing the unstained cells and blue, orange, light green, dark green and pink curves representing respectively DMEM, LPS, IL-4, CM Ctrl and CM SEN activation. Mean fluorescence intensity (MFI) is shown for each condition. At least 10,000 cells were analyzed. Data are presented as means \pm STDEV. (n=3) e) Reprogramming of macrophages by the SASP. CD14⁺ cells isolated from peripheral blood spent 3 days in RPMI 1640 containing 8% (v/v) autologous serum in order to induce their differentiation into macrophages. Macrophages were then activated for 24h with lipopolysaccharide (LPS), Ctrl or SEN fibroblast CM (first treatment). After this first period of activation, medium was changed and LPS-activated macrophages spent another 24h in either Ctrl or SEN fibroblast CM (second treatment). IL-6 secretion was measured at all stages to assess M1 profile (reported as cell pg/mL/cell secreted over a 16h period). Data are presented as means \pm STDEV. (n=1) f) Frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing granzyme B, IFN- γ , IL-4 and IL-17A. CD4⁺ and CD8⁺ T cells were isolated from human peripheral blood and cultured in Ctrl or SEN CM for 48h containing 8% (v/v) FBS. T cells were incubated in RPMI 1640 supplemented with brefeldin A for another 16h before being stained for intracellular proteins indicating different activation phenotypes. (n=1) Student t-test were performed. P values < 0.05 were considered as statistically significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

Figure 3. Immune cell populations and their role in senescent cell clearance. a) Schematic of co-culture experiments using human fibroblasts, non irradiated (Ctrl) or irradiated (SEN), and different types of immune cells. BJ-U H2B-GFP fibroblasts are represented in green, DAPI is shown in blue and CD11c surface marker in red. Photo represents a 8 well slide used for co-culture experiments, as seen in OlyVIA, that has been scanned using the Olympus BX61VS slide scanner. Each well is split in three in order to count each section and obtain a mean as well as a standard deviation after counting green nuclei with ImageJ. b) NK-mediated killing. Human

fibroblasts, BJ-U H2B-GFP, were seeded prior to the addition of NK cells isolated from the peripheral blood. NK cells in different effector to target ratios (1:1 or 10:1) were put on top of their targets in RPMI 1640 1% (v/v) FBS containing or not IL-2. Co-culture using PBMCs depleted in NK cells (NK- population) was used to confirm the role of NK cells. Co-culture was maintained for 3 days and then slides were fixed and mounted. Slides were scanned using an Olympus BX61VS slide scanner and images analyzed using ImageJ. Percentage of cell viability was assessed by counting green nuclei left in each well and by comparing each co-culture condition with the control condition (not containing any immune cells). One representative experiment is shown. c) Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)-mediated killing. Co-culture experiment is the same as described in a) except for the fact that RPMI 1640 1% (v/v) FBS was not only complemented with IL-2 but also with anti-CD3 and that the effector to target ratio is 20:1. One representative experiment is shown. d) Role of CD8⁺ T cells in senescent cell clearance. Co-culture experiment is the same as described in a) except for the fact that RPMI 1640 1% (v/v) FBS was not only complemented with IL-2 but also with anti-CD3. One representative experiment is shown. e) Modulation of NK-mediated killing by CD14⁺ cells. Co-culture experiment is the same as described in a) except that in this case co-culture using CD14⁺ cells was maintained for 7 days and neither IL-2 nor anti-CD3 was added. Conditions using PBMCs or PBMCs depleted of CD14⁺ cells (CD14⁻ population) were supplemented with IL-2 and anti-CD3 as discussed before. One representative experiment is shown. Data are presented as means \pm STDEV. (n \geq 3 for all experiments) Student t-test were performed. P values < 0.05 were considered as statistically significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

DISCUSSION
























Depuis qu'elle est reconnue comme étant un processus biologique à part entière et non plus un simple artéfact de culture cellulaire *in vitro*, la sénescence a suscité l'intérêt de nombreux membres de la communauté scientifique. Que ce soit de par son rôle dans le développement embryonnaire, le vieillissement, la réparation tissulaire ou la tumorigénèse, la sénescence gagne en attention, tel qu'en témoigne les récentes thérapies sénolytiques visant spécifiquement les cellules sénescents (132, 133). Dans l'optique de contribuer à l'avancement scientifique qui a trait à la sénescence cellulaire, nous avons décidé d'étudier le mécanisme par lequel les cellules sénescents modulent leur microenvironnement, et plus précisément les cellules immunitaires qui l'habitent et qui sont en charge de l'élimination des cellules sénescents.

Dans le cadre de ce projet, nous avons porté une attention particulière aux interactions existant entre les cellules sénescents et les M ϕ étant donné le rôle central de ces derniers dans la régulation du processus inflammatoire. En effet, tel que mentionné précédemment, les M ϕ sont non seulement parmi les premiers arrivés au site d'inflammation une fois la réponse inflammatoire enclenchée, mais ils ont la capacité de changer d'un profil anti-inflammatoire (M2) à un profil pro-inflammatoire (M1) et vice-versa en réponse à des signaux environnementaux (57, 58). Afin de caractériser les interactions existant entre les cellules sénescents et les M ϕ , mais aussi celles avec les autres types de cellules immunitaires, nous avons utilisé un modèle de cellules humaines. Cela nous permet de nous démarquer des études précédentes utilisant des modèles murins. En effet, il est reconnu que le système immunitaire des souris et celui des humains sont différents (134) et par conséquent, le processus d'élimination des cellules sénescents pourrait se dérouler autrement chez l'humain.

Dans l'optique de prévoir et d'expliquer les effets du SASP sur les cellules immunitaires, nous avons d'abord mesuré la concentration de 40 différentes protéines contenues dans le SASP de fibroblastes humains, les HCA2-hTERT, une lignée cellulaire dont la sénescence a déjà été bien caractérisée (7). Nous avons pu confirmer que le SASP est hautement pro-inflammatoire, tel que décrit précédemment (8), et que toutes les protéines testées étaient davantage sécrétées par les cellules sénescents que par les cellules contrôles, parfois jusqu'à 1000 fois plus. Parmi ces protéines, plusieurs d'entre elles ont des fonctions en lien avec le système immunitaire :

activation, recrutement, différenciation, etc. C'est le cas de CXCL8, la protéine montrant la plus grande surexpression dans le SASP, qui est une chimiokine principalement connue pour sa capacité à activer et à recruter les neutrophiles (125). Dans le même ordre d'idée, CCL2, aussi connu sous le nom de MCP-1, est augmenté au-delà de 100 fois dans le SASP et peut avoir un impact direct sur le recrutement des monocytes, et donc sur l'arrivée de nouveaux macrophages dans le microenvironnement inflammatoire (126). GM-CSF, une autre protéine fortement sécrétée par les cellules sénescents, a comme rôle la gouvernance de l'activité des Mφ (135). De manière plus précise, huit des dix protéines étant le plus fortement sécrétées par les cellules sénescents ont des fonctions en lien avec le système immunitaire (Tableau 2). Il n'est pas étonnant de constater que les fonctions principales du SASP identifiées sont celles de recrutement et d'activation des cellules immunitaires puisque le SASP avait déjà été associé à ce genre d'évènements (11, 12). Il est aussi intéressant de constater que la biologie des monocytes/Mφ est affectée par la majorité des protéines fortement surexprimées (Tableau 2). Cela met de l'avant l'importance d'étudier les interactions pouvant exister entre les cellules sénescents et les Mφ. Toutefois, cette vue d'ensemble des protéines du SASP permet aussi de constater que plusieurs autres types de cellules immunitaires peuvent être régulés, et ainsi avoir un rôle à jouer dans l'élimination des cellules sénescents.

Tableau 2. Sommaire des protéines les plus présentes dans le SASP et de leurs fonctions.

Protéine	CXCL8	CCL2	IL-6	VEGFR-1	SAA	CCL22	GM-CSF	CXCL10
Cible								
Fonction	 	 	   	 			 	
Référence	125, 136, 137	138, 139, 140	141, 142, 143, 144	145, 146	147	148	149, 150	151, 152

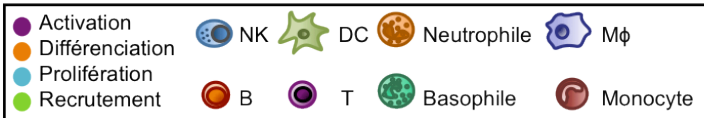


Tableau récapitulatif des protéines parmi les dix plus abondantes dans le SASP ayant des fonctions régulatrices immunitaires.

Afin d'étudier l'influence du SASP sur les M ϕ , nous avons d'abord vérifié que le SASP était capable d'induire une activation chez les M ϕ . Quoique la mobilité des M ϕ ThP1 ne semble pas être affectée par le SASP, nous avons pu confirmer que le SASP est bel et bien en mesure d'induire l'invasion chez les M ϕ ThP1. Étant donné que la mobilité des M ϕ (i.e. vitesse, distance parcourue, etc.) n'est pas nécessairement en corrélation directe avec leur activation, les résultats du test de mobilité devraient être interprétés avec précaution. Des tests supplémentaires tels que des essais de réparation tissulaire (*wound healing assays*) nous permettraient de mieux caractériser les fonctions des M ϕ activés par le SASP.

Désirant caractériser plus en profondeur le profil inflammatoires des M ϕ suite à une exposition au SASP, nous avons évalué la composition de leur sécrétome via l'analyse de 40 différentes protéines pouvant être contenues dans ce dernier. Le CM des M ϕ exposés au SASP contient une multitude de protéines pro-inflammatoires, ce qui suggère un profil M1. Sachant que les M ϕ pro-inflammatoires ont des propriétés anti-tumorales (Tableau 1) et que la sénescence est, à la base, un processus suppresseur de tumeurs (18, 19), ce résultat est cohérent. Toutefois, une analyse approfondie des marqueurs de surface exprimés par les macrophages activés dans le SASP montre que ceux-ci sont fortement anti-inflammatoires. Gardant en tête que la sénescence est aussi impliquée dans la réparation tissulaire (32) et que ce sont les M ϕ anti-inflammatoires qui sont impliqués dans ce même processus (Tableau 1), ce second résultat concernant la biologie des M ϕ est aussi sensé. Nous pensons donc que les M ϕ peuvent être influencés par le SASP et développer un profil inflammatoire spécifique au SASP possédant des caractéristiques des profils M1 et M2. Ce profil inflammatoire particulier permettrait aux M ϕ de participer au recrutement d'autres cellules immunitaires grâce à leurs particularités M1, mais aussi de contribuer à la résolution de l'inflammation suite à l'élimination des cellules sénescents. Nos données de sécrétion d'IL-6 suggèrent aussi que le SASP possède les éléments nécessaires pour non seulement programmer les macrophages naïfs, mais aussi les macrophages déjà polarisés. Néanmoins, des réplicats expérimentaux supplémentaires, l'utilisation de plus de contrôles ainsi que la mesure d'autres protéines contenues dans le CM des M ϕ reprogrammés sont nécessaires afin d'obtenir des résultats solides et statistiquement significatifs. Il serait de mise d'évaluer

l'impact du CM des M ϕ activés dans le SASP sur d'autres types de cellules immunitaires. Cela nous permettrait de mieux détailler le réseau d'interactions présentes dans ce contexte.

Comme les cellules sénescents surexpriment plusieurs protéines capables d'avoir un impact sur les monocytes (Tableau 2), nous avons vérifié si le SASP pouvait affecter leur différenciation en M ϕ . Nous avons donc mis en culture une lignée de monocytes humains, les ThP1, dans du SASP contenant un agent reconnu pour induire leur différenciation, la PMA. Afin d'examiner la différenciation des monocytes, nous avons évalué leur niveau d'adhérence, puisque seuls les M ϕ adhèrent au plastique, ainsi que leur niveau d'expression de CD11c, un marqueur spécifique aux ThP1 différenciés en M ϕ . Le SASP ne semble pas avoir un effet sur la différenciation des monocytes en M ϕ , puisque ni l'adhérence ni l'expression de CD11c n'a été modulée de manière différentielle. Ces résultats sont en accord avec ce qui a été observé précédemment i.e. que le SASP contient des facteurs affectant davantage l'activation et le recrutement des cellules immunitaires et non leur différenciation. Toutefois, la répétition de ces expériences nous permettrait de conclure ceci avec certitude. L'utilisation de monocytes isolés du sang périphérique serait une autre méthode pour confirmer les observations faites quant aux interactions entre les cellules sénescents et les monocytes. Ceci constituerait bel et bien une amélioration du protocole puisque l'utilisation de cellules primaires permet de mieux illustrer ce qui se déroule dans le corps humain. De plus, la lignée cellulaire des ThP1 a été isolée d'un patient atteint d'une leucémie aiguë myéloblastique (LAM) de type monocyttaire et non d'un donneur sain. Des expériences liées à la biologie des monocytes, tels que des essais de migration, nous permettrait aussi de déterminer si le SASP peut avoir un effet à d'autres niveaux du développement des monocytes. Il est fort probable que les effets du SASP ne se reflètent que sur la migration des monocytes qui serait, dans ce cas, accrue.

Suite à ces expériences mettant indirectement en contact les cellules sénescents et immunitaires, nous avons procédé à des expériences de co-culture directe. Grâce à ce modèle, nous avons pu observer et identifier les acteurs importants dans l'élimination des cellules sénescents. Nous avons d'abord mis en co-culture des fibroblastes humains infectés avec une protéine de fusion H2B-GFP avec des PBMCs isolés du sang périphérique. L'usage de cette dernière population cellulaire a mis de l'avant la nécessité d'activer *in vitro* les cellules immunitaires avec de l'IL-2

et de l'anti-CD3 (nécessaire pour l'activation des lymphocytes T) afin de pouvoir observer une élimination de nos fibroblastes cibles contrôles ou sénescents. Le SASP des fibroblastes humains normaux sénescents n'est probablement pas assez fort dans ce contexte pour activer les cellules immunitaires au point d'engendrer leur élimination. De plus, nous avons pu observer que, dans ces conditions, les cellules immunitaires tuent de manière aspécifique les cellules contrôles tout comme les cellules sénescents. L'hyperactivation des cellules immunitaires, ainsi que l'utilisation d'un système hétérologue causent sans aucun doute quelques difficultés et nous empêchent de pouvoir observer en toute clarté le réel processus. Ainsi, il nous faudrait développer une lignée de fibroblastes humains dérivés de la même personne fournissant les cellules immunitaires. De cette manière, toute alloréactivité pourrait être évitée. Malgré ses failles, ce modèle de co-culture reste intéressant et valide puisqu'il nous permet tout de même de tirer des conclusions sur les cellules impliquées dans l'élimination des cellules sénescents tel que décrit ci-dessous.

Suite à cette première observation, nous nous sommes penchés sur l'implication des cellules NK, puisque de multiples publications précédentes mettent de l'avant leur rôle dans l'élimination des cellules sénescents (11, 12, 76, 91, 92). Nous avons donc généré une population de PBMCs ne contenant pas de cellules NK, i.e. la population NK⁻, ainsi qu'une population constituée de cellules NK seules. Sans grande surprise, la population NK⁻ a des capacités d'élimination réduites par rapport aux PBMCs possédant une population normale de cellules NK. Les cellules NK seules, elles, n'étaient pas aptes à éliminer les cellules sénescents lorsqu'utilisées dans un ratio 1 :1 (effecteur : cible). Curieusement, les cellules NK, lorsqu'utilisées dans un ratio 10 :1 étaient capables de tuer spécifiquement les cellules sénescents. Ce résultat obtenu avec des lignées primaires confirme ce qui a été démontré par Krizhanovsky *et al.* via la lignée cellulaire de NK YT (12), à la différence que les cellules NK primaires ont besoin d'une activation avec l'IL-2 afin de tuer leurs cellules cibles. Cela pourrait être expliqué par le fait que la lignée YT est dérivée d'un patient atteint d'une leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) alors que nos cellules NK proviennent de donneurs sains. Toutefois, la spécificité des cellules NK lors de l'utilisation du ratio 10 :1 contraste avec la non-spécificité des PBMCs activés qui éliminent indifféremment les cellules contrôles et sénescents. La spécificité des cellules NK, même dans un modèle hétérologue, souligne les propriétés de ces cellules à cibler les cellules sénescents. Des

expériences *in vivo* seraient nécessaires afin de conclure avec certitude que les cellules NK sont en charge de l'élimination directe des cellules sénescents, quoique les évidences *in vitro* soient convaincantes. Cette spécificité des cellules NK pour les cellules sénescents devrait être explorée davantage pour expliquer les mécanismes qui régissent ce processus et qui permettent aux cellules NK de faire la distinction entre les cellules saines et sénescents. De cette manière, il serait possible d'identifier quelles protéines sécrétées ou molécules de surface dictent la surveillance des cellules immunitaires et pourraient être modulées dans l'optique de promouvoir l'élimination des cellules sénescents. Pour ce faire, il serait possible de bloquer les protéines potentiellement impliquées avec, par exemple, des anticorps bloquant.

La littérature suggère une collaboration de différents types de cellules immunitaires dans le contexte de l'élimination des cellules sénescents. C'est pourquoi nous avons étudié l'effet du SASP sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Les cellules T CD4⁺ exposées au SASP démontrent une polarisation de type Th2, alors que les cellules T CD8⁺ ne subissent que peu de changements au niveau de leur activation. Effectivement, d'importantes quantités d'IL-4 sont sécrétées par les lymphocytes T CD4⁺ suite à une exposition de 48h au SASP. Ces observations regardant les effets immunosuppresseurs du SASP sont en accord avec des papiers publiés précédemment dans lesquels les auteurs classent la sénescence comme un mécanisme immunosuppresseur (129). La sécrétion d'IL-6 par les cellules sénescents et les Mφ activés par le SASP est probablement responsable de cette polarisation Th2 (130, 131). Par contre, ces résultats contredisent ce qui a été décrit par Kang *et al.*, i.e. une polarisation Th1 chez les lymphocytes T CD4⁺ dans ce même contexte (88). Considérant les différences existant entre le système immunitaire des souris et celui des hommes, il est possible que les cellules T CD4⁺ n'aient pas le même rôle selon des espèces, ce qui expliquerait pourquoi nos résultats diffèrent. Par exemple, CD28, fournissant un signal de co-stimulation chez les cellules T, est exprimé par 100% des lymphocytes T CD4⁺ murins alors que chez les humains ce pourcentage est de 80% (134). D'un point de vue d'ensemble, ces résultats de polarisation démontrent de fortes propriétés anti-inflammatoires associées au SASP. Ceci suggère que les cellules sénescents sont capables de recruter les cellules immunitaires et ensuite d'induire une polarisation anti-inflammatoire. Cela montre bien les propriétés antagonistes associées au SASP. Des réplicats expérimentaux supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer avec certitude les observations faites. Utilisant notre modèle

de co-culture directe, nous avons étudié le rôle des cellules T CD8⁺, qui peuvent avoir une activité cytotoxique et peuvent donc participer à l'élimination directe des cellules sénescents. En utilisant une population de cellules T CD8⁺ dérivées du sang, dans plusieurs ratios « effecteur : cible » différents, nous avons pu observer que les cellules T CD8⁺ seules ne sont pas capables d'éliminer les cellules sénescents. Assez curieusement, l'élimination des cellules sénescents a été complètement abrogée lorsque les cellules T CD8⁺ ont été retirées de la population de PBMCs. Ce résultat suggère que les CTLs ne sont pas en charge de l'élimination directe des cellules sénescents, mais qu'elles ont, d'une quelconque manière, un rôle important à jouer durant ce processus, probablement dans la régulation du microenvironnement. Leur impact sur l'élimination des cellules sénescents est probablement dû à la sécrétion de protéines qui pourraient aider et activer les cellules en charge de l'élimination directe. Ce rôle d'entraide des CTLs devrait être le sujet d'une étude approfondie afin de déterminer la réelle importance de ce type de cellules immunitaires dans l'élimination des cellules sénescents. L'isolement de d'autres types de cellules immunitaires, telles que les cellules T CD4⁺, suspectées d'avoir un rôle à jouer lors de ce processus devrait aussi être effectué, afin de déterminer la dynamique d'interactions associée à l'élimination des cellules sénescents.

Puisque nos résultats concernant les effets du SASP sur la biologie des Mφ nous ont convaincu de l'existence d'interactions entre les cellules sénescents et les Mφ, nous avons décidé de poursuivre notre investigation en créant une population de Mφ seuls ainsi qu'une population de PBMCs ne contenant pas de Mφ, i.e. la population CD14⁻. Ceci a été rendu possible grâce à une sélection positive des cellules CD14⁺ qui sont ciblées avec un complexe d'anticorps reconnaissant le CD14 sur lequel se fixent par la suite des particules magnétiques. Tel que supposé, les Mφ seuls ont été incapables d'éliminer les cellules sénescents. Ce résultat n'est effectivement pas tellement étonnant puisque les cellules sénescents grandissent en taille et sont aussi ou même parfois plus imposantes que les Mφ. Par exemple, les fibroblastes humains mesurent environ dix à quinze microns lorsqu'ils sont non sénescents. Une fois entrés en sénescence, ils peuvent grandir de manière à, parfois, doubler leur taille (1). Les Mφ qui mesurent environ vingt-et-un microns ont plus de facilité à phagocyter les particules de petites tailles i.e. deux ou trois microns (153). Ces derniers ne pourraient donc pas utiliser leurs aptitudes de phagocytes envers les cellules sénescents. En ce qui a trait à la population CD14⁻, le retrait des

M ϕ a pour effet de moduler l'élimination des cellules sénescents faites par les cellules NK. En effet, l'élimination des cellules sénescents se fait plus rapidement, ce qui suggère que les M ϕ ont un profil anti-inflammatoire. Cette observation va de pair avec celle d'une population de M ϕ activée dans le SASP ayant un profil de marqueurs de surface anti-inflammatoires. Dans ce modèle de co-culture, il semble cohérent que les M ϕ aient un effet immunosuppresseur, puisque leur objectif est de mettre un terme à la réponse inflammatoire. En effet, à ce moment de la co-culture, tous les acteurs nécessaires à l'élimination des cellules sénescents sont présents au site d'inflammation et leur recrutement par les M ϕ n'est donc plus nécessaire. Nous imaginons donc que les M ϕ modulent leur profil de polarisation dans le temps afin de favoriser l'élimination des cellules sénescents. Dans un premier temps, les M ϕ utiliseraient leur sécrétion pro-inflammatoire pour participer au recrutement des autres acteurs importants pour l'élimination des cellules sénescents. Par la suite, les M ϕ deviendraient davantage immunosuppresseurs afin de mettre un terme à la réponse inflammatoire. Ce changement de profil permettrait de prévenir l'inflammation chronique et ainsi les dommages tissulaires durant l'élimination des cellules sénescents.

CONCLUSION

L'élimination des cellules sénescents est un processus biologique complexe et mettant en jeu une multitude d'acteurs immunitaires. Il y a moins de dix ans, la communauté scientifique a commencé à s'intéresser à ce phénomène et à sa démystification, puisqu'il est maintenant clair que l'accumulation des cellules sénescents est problématique. En effet, la persistance des cellules sénescents dans l'organisme crée de l'inflammation chronique et participe au développement de maladies associées au vieillissement. C'est dans l'optique de mieux comprendre ce phénomène d'élimination que nous avons caractérisé les interactions existant entre les cellules sénescents et immunitaires. Ce projet nous a permis de confirmer que les cellules NK sont en charge de l'élimination spécifique des cellules immunitaires et que les lymphocytes T CD8⁺ sont aussi importants pour le bon déroulement de ce processus. Nous avons aussi pu caractériser la réponse des lymphocytes T CD4⁺ exposés au SASP et constater qu'une polarisation Th2 prédominait. Cette même tendance immunosuppressive semble être présente chez les M ϕ exposés au SASP. Il est maintenant clair que les M ϕ jouent un rôle limité dans

l'élimination directe des cellules sénescents. Toutefois, ils orchestrent l'activité d'autres cellules immunitaires impliquées dans le processus en modulant, par exemple, l'élimination dépendante des cellules NK. Une meilleure compréhension de l'élimination des cellules sénescents pourrait mener au développement de thérapies centrées sur la manipulation de la réponse des M ϕ au SASP. Cela permettrait de promouvoir une résolution ordonnée des dommages tissulaires dans le contexte de maladies associées au vieillissement et menant à l'inflammation.

PERSPECTIVES

Ce projet nous a donné un bon aperçu de l'étendu de la complexité des interactions existant non seulement entre les cellules sénescents et immunitaires, mais aussi entre les différents types de cellules immunitaires. Afin de mieux comprendre la mécanistique de l'élimination des cellules sénescents et d'identifier les molécules qui sont impliquées dans ce processus, il serait essentiel d'effectuer des expériences supplémentaires. Nous voulons d'abord développer un modèle de co-culture autologue faisant interagir des fibroblastes humains provenant du même donneur que les cellules immunitaires. Cela nous permettrait d'éliminer l'alloréactivité et d'obtenir un modèle encore plus près de la réalité.

Nous souhaitons aussi expliquer l'élimination spécifique des cellules sénescents par les cellules NK. Pour ce faire, nous allons utiliser des anticorps afin de bloquer certaines protéines contenues dans le SASP (ex : CCL2) ainsi que certaines interactions se faisant via des ligands de surface (ex : NKG2D-NKG2DL). Ce même type d'expériences nous donnerait l'opportunité d'évaluer l'impact de ces protéines sur les M ϕ et les lymphocytes T. Cela nous permettrait donc de savoir si une molécule est particulièrement importante ou si elle est dispensable. Ainsi, nous pourrions essayer de moduler son expression pour favoriser l'élimination des cellules sénescents.

Par la suite, nous désirons utiliser un modèle murin afin de pouvoir effectuer des expériences *in vivo*. Nous pourrions nous doter d'une lignée murine déjà décrite comme étant un modèle de sénescence accélérée, i.e. une *senescence-accelerated mouse (SAM) strain*, et réaliser une élimination systémique des M ϕ . Cela nous permettrait dans un premier temps d'étudier l'effet du retrait des M ϕ sur l'accumulation des cellules sénescents dans ce modèle de vieillissement. La reprogrammation *ex vivo* de ces M ϕ de manière à leur donner un profil pro-inflammatoire, puis leur réinjection dans les souris d'origine nous permettrait d'évaluer si une programmation M1 limiterait l'accumulation des cellules sénescents. Nous pourrions aussi utiliser un modèle murin

capable de développer des tumeurs sous-cutanées après injection de cellules tumorales et évaluer les effets des M ϕ activés au SASP. Pour ce faire, nous isolerions les M ϕ de ces souris et les activerions au SASP avant de les réinjecter dans les tumeurs. Cela nous permettrait d'évaluer l'effet des ces M ϕ sur le développement tumoral.

Nous souhaitons aussi étudier les interactions existant entre les cellules sénescences cancéreuses et les cellules immunitaires. Nos résultats préliminaires montrent que les interactions sont différentes selon le type de cellules cancéreuses utilisé (ex : cancer de la prostate, cancer du sein, cancer de la peau, cancer des ovaires, etc.). Dans le même ordre d'idées, nous souhaitons réaliser l'activation des M ϕ avec du SASP de cellules épithéliales et endothéliales afin de comparer le profil inflammatoire des M ϕ selon les types cellulaires utilisés. C'est peut-être en nous concentrant sur ces différences que nous réussirons à identifier les molécules importantes pour l'élimination des cellules sénescences.

Enfin, une fois que nous aurons une bonne compréhension des interactions existant entre M ϕ et cellules sénescences, nous pourrions moduler le profil des M ϕ dans le contexte, par exemple, du cancer. Il nous serait en effet possible d'induire la sénescence via la radiothérapie ou la chimiothérapie puis d'effectuer une immunothérapie centrée sur les M ϕ . Le profil inflammatoire des M ϕ pourrait donc être modulé afin de promouvoir l'élimination des cellules sénescences induites par la première thérapie avant d'être réinjectés au patient. Il nous faut donc continuer d'explorer l'influence du SASP sur les M ϕ et les autres cellules immunitaires afin de pouvoir, dans un avenir prochain, se servir de ces nouvelles connaissances pour améliorer l'efficacité des traitements offerts en milieu hospitalier.

BIBLIOGRAPHIE

1. Hayflick, L., and P. S. Moorhead. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.
2. Rodier, F., and J. Campisi. 2011. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 192: 547-556.
3. Probin, V., Y. Wang, A. Bai, and D. Zhou. 2006. Busulfan selectively induces cellular senescence but not apoptosis in WI38 fibroblasts via a p53-independent but extracellular signal-regulated kinase-p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 551-560.

4. Kracikova, M., G. Akiri, A. George, R. Sachidanandam, and S. A. Aaronson. 2013. A threshold mechanism mediates p53 cell fate decision between growth arrest and apoptosis. *Cell Death Differ* 20: 576-588.
5. Childs, B. G., M. Durik, D. J. Baker, and J. M. van Deursen. 2015. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med* 21: 1424-1435.
6. Ohtani, N., K. Yamakoshi, A. Takahashi, and E. Hara. 2004. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest* 51: 146-153.
7. Rodier, F., J. P. Coppe, C. K. Patil, W. A. Hoeijmakers, D. P. Munoz, S. R. Raza, A. Freund, E. Campeau, A. R. Davalos, and J. Campisi. 2009. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11: 973-979.
8. Coppe, J. P., P. Y. Desprez, A. Krtolica, and J. Campisi. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5: 99-118.
9. Acosta, J. C., A. O'Loughlen, A. Banito, M. V. Guijarro, A. Augert, S. Raguz, M. Fumagalli, M. Da Costa, C. Brown, N. Popov, Y. Takatsu, J. Melamed, F. d'Adda di Fagagna, D. Bernard, E. Hernando, and J. Gil. 2008. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* 133: 1006-1018.
10. Kuilman, T., C. Michaloglou, L. C. Vredeveld, S. Douma, R. van Doorn, C. J. Desmet, L. A. Aarden, W. J. Mooi, and D. S. Peeper. 2008. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 133: 1019-1031.
11. Xue, W., L. Zender, C. Miething, R. A. Dickins, E. Hernando, V. Krizhanovsky, C. Cordon-Cardo, and S. W. Lowe. 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445: 656-660.
12. Krizhanovsky, V., M. Yon, R. A. Dickins, S. Hearn, J. Simon, C. Miething, H. Yee, L. Zender, and S. W. Lowe. 2008. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 134: 657-667.
13. Krtolica, A., S. Parrinello, S. Lockett, P. Y. Desprez, and J. Campisi. 2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12072-12077.
14. Davalos, A. R., J. P. Coppe, J. Campisi, and P. Y. Desprez. 2010. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 29: 273-283.

15. Laberge, R. M., P. Awad, J. Campisi, and P. Y. Desprez. 2012. Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. *Cancer Microenviron* 5: 39-44.
16. Beausejour, C. M., A. Krtolica, F. Galimi, M. Narita, S. W. Lowe, P. Yaswen, and J. Campisi. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 22: 4212-4222.
17. Chen, Z., L. C. Trotman, D. Shaffer, H. K. Lin, Z. A. Dotan, M. Niki, J. A. Koutcher, H. I. Scher, T. Ludwig, W. Gerald, C. Cordon-Cardo, and P. P. Pandolfi. 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436: 725-730.
18. Bartkova, J., N. Rezaei, M. Liontos, P. Karakaidos, D. Kletsas, N. Issaeva, L. V. Vassiliou, E. Kolettas, K. Niforou, V. C. Zoumpourlis, M. Takaoka, H. Nakagawa, F. Tort, K. Fugger, F. Johansson, M. Sehested, C. L. Andersen, L. Dyrskjot, T. Orntoft, J. Lukas, C. Kittas, T. Helleday, T. D. Halazonetis, J. Bartek, and V. G. Gorgoulis. 2006. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444: 633-637.
19. Michaloglou, C., L. C. Vredevelt, M. S. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, C. M. van der Horst, D. M. Majoor, J. W. Shay, W. J. Mooi, and D. S. Peeper. 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436: 720-724.
20. Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, and et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9363-9367.
21. Herbig, U., M. Ferreira, L. Condel, D. Carey, and J. M. Sedivy. 2006. Cellular senescence in aging primates. *Science* 311: 1257.
22. Jeyapalan, J. C., M. Ferreira, J. M. Sedivy, and U. Herbig. 2007. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev* 128: 36-44.
23. Krishnamurthy, J., C. Torrice, M. R. Ramsey, G. I. Kovalev, K. Al-Regaiey, L. Su, and N. E. Sharpless. 2004. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 114: 1299-1307.
24. Sedelnikova, O. A., I. Horikawa, D. B. Zimonjic, N. C. Popescu, W. M. Bonner, and J. C. Barrett. 2004. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 6: 168-170.
25. Wang, C., D. Jurk, M. Maddick, G. Nelson, C. Martin-Ruiz, and T. von Zglinicki. 2009. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* 8: 311-323.

26. Minamino, T., and I. Komuro. 2007. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ Res* 100: 15-26.
27. Wiemann, S. U., A. Satyanarayana, M. Tsahuridu, H. L. Tillmann, L. Zender, J. Klempnauer, P. Flemming, S. Franco, M. A. Blasco, M. P. Manns, and K. L. Rudolph. 2002. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J* 16: 935-942.
28. Price, J. S., J. G. Waters, C. Darrah, C. Pennington, D. R. Edwards, S. T. Donell, and I. M. Clark. 2002. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* 1: 57-65.
29. Baker, D. J., T. Wijshake, T. Tchkonja, N. K. LeBrasseur, B. G. Childs, B. van de Sluis, J. L. Kirkland, and J. M. van Deursen. 2011. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479: 232-236.
30. Munoz-Espin, D., M. Canamero, A. Maraver, G. Gomez-Lopez, J. Contreras, S. Murillo-Cuesta, A. Rodriguez-Baeza, I. Varela-Nieto, J. Ruberte, M. Collado, and M. Serrano. 2013. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155: 1104-1118.
31. Storer, M., A. Mas, A. Robert-Moreno, M. Pecoraro, M. C. Ortells, V. Di Giacomo, R. Yosef, N. Pilpel, V. Krizhanovsky, J. Sharpe, and W. M. Keyes. 2013. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155: 1119-1130.
32. Demaria, M., N. Ohtani, S. A. Youssef, F. Rodier, W. Toussaint, J. R. Mitchell, R. M. Laberge, J. Vijg, H. Van Steeg, M. E. Dolle, J. H. Hoeijmakers, A. de Bruin, E. Hara, and J. Campisi. 2014. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* 31: 722-733.
33. Chuprin, A., H. Gal, T. Biron-Shental, A. Biran, A. Amiel, S. Rozenblatt, and V. Krizhanovsky. 2013. Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. *Genes Dev* 27: 2356-2366.
34. Williams, G. C. 1957. Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution* 11: 398-411.
35. Giaimo, S., and F. d'Adda di Fagagna. 2012. Is cellular senescence an example of antagonistic pleiotropy? *Aging Cell* 11: 378-383.
36. Campisi, J. 2003. Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer* 3: 339-349.
37. Campisi, J. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120: 513-522.
38. Hato, T., and P. C. Dagher. 2015. How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble. *Clin J Am Soc Nephrol* 10: 1459-1469.

39. Mosser, D. M., and J. P. Edwards. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958-969.
40. Parihar, A., T. D. Eubank, and A. I. Doseff. 2010. Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. *J Innate Immun* 2: 204-215.
41. Sleasman, J. W., B. H. Leon, L. F. Aleixo, M. Rojas, and M. M. Goodenow. 1997. Immunomagnetic selection of purified monocyte and lymphocyte populations from peripheral blood mononuclear cells following cryopreservation. *Clin Diagn Lab Immunol* 4: 653-658.
42. Dey, A., J. Allen, and P. A. Hankey-Giblin. 2014. Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages. *Front Immunol* 5: 683.
43. Wynn, T. A., and K. M. Vannella. 2016. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 44: 450-462.
44. Davies, L. C., S. J. Jenkins, J. E. Allen, and P. R. Taylor. 2013. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14: 986-995.
45. Perdiguero, E. G., K. Klapproth, C. Schulz, K. Busch, M. de Bruijn, H. R. Rodewald, and F. Geissmann. 2015. The Origin of Tissue-Resident Macrophages: When an Erythro-myeloid Progenitor Is an Erythro-myeloid Progenitor. *Immunity* 43: 1023-1024.
46. Jelley-Gibbs, D. M., K. K. Strutt Tm Fau - McKinstry, S. L. McKinstry Kk Fau - Swain, and S. L. Swain. Influencing the fates of CD4 T cells on the path to memory: lessons from influenza.
47. Michel, T., F. Hentges, and J. Zimmer. 2012. Consequences of the crosstalk between monocytes/macrophages and natural killer cells. *Frontiers in Immunology* 3: 403.
48. Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-173.
49. Martinez, F. O., L. Helming, and S. Gordon. 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 27: 451-483.
50. Clària, J., A. González-Pérez, C. López-Vicario, B. Rius, and E. Totos. 2011. New Insights into the Role of Macrophages in Adipose Tissue Inflammation and Fatty Liver Disease: Modulation by Endogenous Omega-3 Fatty Acid-Derived Lipid Mediators. *Frontiers in Immunology* 2: 49.
51. Nakagawa, Y., and K. Chiba. 2014. Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals (Basel)* 7: 1028-1048.

52. Schmid, M. C., and J. A. Varner. 2010. Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. *J Oncol* 2010: 201026.
53. Foey, A. D. 2014. Macrophage Polarisation: A collaboration of Differentiation, Activation and Pre-Programming? *J Clin Cell Immunol* 6: 293.
54. Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141: 52-67.
55. Mohamed, M. M., and B. F. Sloane. 2006. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 764-775.
56. Bingle, L., N. J. Brown, and C. E. Lewis. 2002. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196: 254-265.
57. Saccani, A., T. Schioppa, C. Porta, S. K. Biswas, M. Nebuloni, L. Vago, B. Bottazzi, M. P. Colombo, A. Mantovani, and A. Sica. 2006. p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res* 66: 11432-11440.
58. Guiducci, C., A. P. Vicari, S. Sangaletti, G. Trinchieri, and M. P. Colombo. 2005. Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res* 65: 3437-3446.
59. Smyth, M. J., Y. Hayakawa, K. Takeda, and H. Yagita. 2002. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 850-861.
60. Long, E. O., H. S. Kim, D. Liu, M. E. Peterson, and S. Rajagopalan. 2013. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* 31: 227-258.
61. Chester, C., K. Fritsch, and H. E. Kohrt. 2015. Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting Activating, Inhibitory, and Co-stimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 6: 601.
62. Burke, S., T. Lakshmikanth, F. Colucci, and E. Carbone. 2010. New views on natural killer cell-based immunotherapy for melanoma treatment. *Trends Immunol* 31: 339-345.
63. Cooper, M. A., T. A. Fehniger, and M. A. Caligiuri. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22: 633-640.
64. Kim, S., K. Iizuka, H. L. Aguila, I. L. Weissman, and W. M. Yokoyama. 2000. In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2731-2736.
65. Baker, D. J., B. G. Childs, M. Durik, M. E. Wijers, C. J. Sieben, J. Zhong, R. A. Saltness, K. B. Jeganathan, G. C. Verzosa, A. Pezeshki, K. Khazaie, J. D.

- Miller, and J. M. van Deursen. 2016. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530: 184-189.
66. Jackson, J. G., and O. M. Pereira-Smith. 2006. p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts. *Cancer Res* 66: 8356-8360.
 67. Wang, E. 1995. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res* 55: 2284-2292.
 68. Ryu, S. J., Y. S. Oh, and S. C. Park. 2007. Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts. *Cell Death Differ* 14: 1020-1028.
 69. Rochette, P. J., and D. E. Brash. 2008. Progressive apoptosis resistance prior to senescence and control by the anti-apoptotic protein BCL-xL. *Mech Ageing Dev* 129: 207-214.
 70. Chien, Y., C. Scuoppo, X. Wang, X. Fang, B. Balgley, J. E. Bolden, P. Premrurit, W. Luo, A. Chicas, C. S. Lee, S. C. Kogan, and S. W. Lowe. 2011. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev* 25: 2125-2136.
 71. Sagiv, A., A. Biran, M. Yon, J. Simon, S. W. Lowe, and V. Krizhanovsky. 2013. Granule exocytosis mediates immune surveillance of senescent cells. *Oncogene* 32: 1971-1977.
 72. Soriani, A., A. Zingoni, C. Cerboni, M. L. Iannitto, M. R. Ricciardi, V. Di Gialleonardo, M. Cippitelli, C. Fionda, M. T. Petrucci, A. Guarini, R. Foa, and A. Santoni. 2009. ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood* 113: 3503-3511.
 73. Zingoni, A., F. Cecere, E. Vulpis, C. Fionda, R. Molfetta, A. Soriani, M. T. Petrucci, M. R. Ricciardi, D. Fuerst, M. G. Amendola, J. Mytilineos, C. Cerboni, R. Paolini, M. Cippitelli, and A. Santoni. 2015. Genotoxic Stress Induces Senescence-Associated ADAM10-Dependent Release of NKG2D MIC Ligands in Multiple Myeloma Cells. *J Immunol* 195: 736-748.
 74. Dai, Z., C. J. Turtle, G. C. Booth, S. R. Riddell, T. A. Gooley, A. M. Stevens, T. Spies, and V. Groh. 2009. Normally occurring NKG2D+CD4+ T cells are immunosuppressive and inversely correlated with disease activity in juvenile-onset lupus. *J Exp Med* 206: 793-805.
 75. Diefenbach, A., A. M. Jamieson, S. D. Liu, N. Shastri, and D. H. Raulet. 2000. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 1: 119-126.

76. Sagiv, A., D. G. Burton, Z. Moshayev, E. Vadai, F. Wensveen, S. Ben-Dor, O. Golani, B. Polic, and V. Krizhanovsky. 2016. NKG2D ligands mediate immunosurveillance of senescent cells. *Aging (Albany NY)* 8: 328-344.
77. Salih, H. R., H. Antropius, F. Gieseke, S. Z. Lutz, L. Kanz, H. G. Rammensee, and A. Steinle. 2003. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 102: 1389-1396.
78. Wu, J. D., L. M. Higgins, A. Steinle, D. Cosman, K. Haugk, and S. R. Plymate. 2004. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *J Clin Invest* 114: 560-568.
79. Groh, V., J. Wu, C. Yee, and T. Spies. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419: 734-738.
80. Curran, S., and G. I. Murray. 2000. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36: 1621-1630.
81. Liu, D., and P. J. Hornsby. 2007. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res* 67: 3117-3126.
82. Biran, A., M. Perelmuter, H. Gal, D. G. Burton, Y. Ovadya, E. Vadai, T. Geiger, and V. Krizhanovsky. 2015. Senescent cells communicate via intercellular protein transfer. *Genes Dev* 29: 791-802.
83. Chauveau, A., A. Aucher, P. Eissmann, E. Vivier, and D. M. Davis. 2010. Membrane nanotubes facilitate long-distance interactions between natural killer cells and target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 5545-5550.
84. Davis, D. M., and S. Sowinski. 2008. Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 431-436.
85. Abounit, S., and C. Zurzolo. 2012. Wiring through tunneling nanotubes--from electrical signals to organelle transfer. *J Cell Sci* 125: 1089-1098.
86. Rustom, A., R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther, and H. H. Gerdes. 2004. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 303: 1007-1010.
87. Liu, Y., O. E. Hawkins, Y. Su, A. E. Vilgelm, T. Sobolik, Y. M. Thu, S. Kantrow, R. C. Splittgerber, S. Short, K. I. Amiri, J. A. Ecsedy, J. A. Sosman, M. C. Kelley, and A. Richmond. 2013. Targeting aurora kinases limits tumour growth through DNA damage-mediated senescence and blockade of NF-kappaB impairs this drug-induced senescence. *EMBO Mol Med* 5: 149-166.

88. Kang, T. W., T. Yevsa, N. Woller, L. Hoenicke, T. Wuestefeld, D. Dauch, A. Hohmeyer, M. Gereke, R. Rudalska, A. Potapova, M. Iken, M. Vucur, S. Weiss, M. Heikenwalder, S. Khan, J. Gil, D. Bruder, M. Manns, P. Schirmacher, F. Tacke, M. Ott, T. Luedde, T. Longerich, S. Kubicka, and L. Zender. 2011. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 479: 547-551.
89. Lujambio, A., L. Akkari, J. Simon, D. Grace, D. F. Tschaharganeh, J. E. Bolden, Z. Zhao, V. Thapar, J. A. Joyce, V. Krizhanovsky, and S. W. Lowe. 2013. Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell* 153: 449-460.
90. Hayakawa, Y., and M. J. Smyth. 2006. NKG2D and cytotoxic effector function in tumor immune surveillance. *Semin Immunol* 18: 176-185.
91. Iannello, A., T. W. Thompson, M. Ardolino, S. W. Lowe, and D. H. Raulet. 2013. p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *J Exp Med* 210: 2057-2069.
92. Katlinskaya, Y. V., C. J. Carbone, Q. Yu, and S. Y. Fuchs. 2015. Type 1 interferons contribute to the clearance of senescent cell. *Cancer Biol Ther* 16: 1214-1219.
93. Kansara, M., H. S. Leong, D. M. Lin, S. Popkiss, P. Pang, D. W. Garsed, C. R. Walkley, C. Cullinane, J. Ellul, N. M. Haynes, R. Hicks, M. L. Kuijjer, A. M. Cleton-Jansen, P. W. Hinds, M. J. Smyth, and D. M. Thomas. 2013. Immune response to RB1-regulated senescence limits radiation-induced osteosarcoma formation. *J Clin Invest* 123: 5351-5360.
94. Le Garff-Tavernier, M., V. Beziat, J. Decocq, V. Siguret, F. Gandjbakhch, E. Pautas, P. Debre, H. Merle-Beral, and V. Vieillard. 2010. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell* 9: 527-535.
95. Qin, L., X. Jing, Z. Qiu, W. Cao, Y. Jiao, J. P. Routy, and T. Li. 2016. Aging of immune system: immune signature from peripheral blood lymphocyte subsets in 1068 healthy adults. *Aging (Albany NY)*.
96. Effros, R. B., and G. Pawelec. 1997. Replicative senescence of T cells: does the Hayflick Limit lead to immune exhaustion? *Immunol Today* 18: 450-454.
97. Effros, R. B., M. Dagarag, C. Spaulding, and J. Man. 2005. The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. *Immunol Rev* 205: 147-157.
98. Liu, Y., H. K. Sanoff, H. Cho, C. E. Burd, C. Torrice, J. G. Ibrahim, N. E. Thomas, and N. E. Sharpless. 2009. Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell* 8: 439-448.

99. Fujisaki, H., H. Kakuda, C. Imai, C. G. Mullighan, and D. Campana. 2009. Replicative potential of human natural killer cells. *Br J Haematol* 145: 606-613.
100. Hazeldine, J., P. Hampson, and J. M. Lord. 2012. Reduced release and binding of perforin at the immunological synapse underlies the age-related decline in natural killer cell cytotoxicity. *Aging Cell* 11: 751-759.
101. Camous, X., A. Pera, R. Solana, and A. Larbi. 2012. NK cells in healthy aging and age-associated diseases. *J Biomed Biotechnol* 2012: 195956.
102. Stout, R. D., and J. Suttles. 2005. Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. *Immunol Rev* 205: 60-71.
103. Herrero, C., L. Marques, J. Lloberas, and A. Celada. 2001. IFN-gamma-dependent transcription of MHC class II IA is impaired in macrophages from aged mice. *J Clin Invest* 107: 485-493.
104. Meissner, M., T. E. Reichert, M. Kunkel, W. Gooding, T. L. Whiteside, S. Ferrone, and B. Seliger. 2005. Defects in the human leukocyte antigen class I antigen processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 11: 2552-2560.
105. Seliger, B., K. Schreiber, K. Delp, M. Meissner, S. Hammers, T. Reichert, K. Pawlischko, R. Tampe, and C. Huber. 2001. Downregulation of the constitutive tapasin expression in human tumor cells of distinct origin and its transcriptional upregulation by cytokines. *Tissue Antigens* 57: 39-45.
106. Johnsen, A. K., D. J. Templeton, M. Sy, and C. V. Harding. 1999. Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *J Immunol* 163: 4224-4231.
107. Rotem-Yehudar, R., M. Groettrup, A. Soza, P. M. Kloetzel, and R. Ehrlich. 1996. LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for class I MHC molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic adenovirus 12. *J Exp Med* 183: 499-514.
108. Shevach, E. M. 2004. Regulatory/suppressor T cells in health and disease. *Arthritis Rheum* 50: 2721-2724.
109. Vinay, D. S., E. P. Ryan, G. Pawelec, W. H. Talib, J. Stagg, E. Elkord, T. Lichter, W. K. Decker, R. L. Whelan, H. M. Kumara, E. Signori, K. Honoki, A. G. Georgakilas, A. Amin, W. G. Helferich, C. S. Boosani, G. Guha, M. R. Ciriolo, S. Chen, S. I. Mohammed, A. S. Azmi, W. N. Keith, A. Bilsland, D. Bhakta, D. Halicka, H. Fujii, K. Aquilano, S. S. Ashraf, S. Newsheen, X. Yang, B. K. Choi, and B. S. Kwon. 2015. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol* 35 Suppl: S185-198.

110. Chanmee, T., P. Ontong, K. Konno, and N. Itano. 2014. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)* 6: 1670-1690.
111. Gabrilovich, D. I., and S. Nagaraj. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9: 162-174.
112. Swaika, A., W. A. Hammond, and R. W. Joseph. 2015. Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. *Mol Immunol* 67: 4-17.
113. Shields, J. D., I. C. Kourtis, A. A. Tomei, J. M. Roberts, and M. A. Swartz. 2010. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science* 328: 749-752.
114. Zindl, C. L., and D. D. Chaplin. 2010. Immunology. Tumor immune evasion. *Science* 328: 697-698.
115. Sparmann, A., and D. Bar-Sagi. 2004. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* 6: 447-458.
116. Tamm, I., T. Kikuchi, I. Cardinale, and J. G. Krueger. 1994. Cell-adhesion-disrupting action of interleukin 6 in human ductal breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3329-3333.
117. Campeau, E., V. E. Ruhl, F. Rodier, C. L. Smith, B. L. Rahmberg, J. O. Fuss, J. Campisi, P. Yaswen, P. K. Cooper, and P. D. Kaufman. 2009. A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One* 4: e6529.
118. Rodier, F. 2013. Detection of the senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Methods Mol Biol* 965: 165-173.
119. Daigneault, M., J. A. Preston, H. M. Marriott, M. K. Whyte, and D. H. Dockrell. 2010. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 5: e8668.
120. Schwende, H., E. Fitzke, P. Ambs, and P. Dieter. 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol* 59: 555-561.
121. Martinez, F. O., and S. Gordon. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6: 13.
122. Marshall, N. B., and S. L. Swain. 2011. Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *J Biomed Biotechnol* 2011: 954602.
123. Quezada, S. A., T. R. Simpson, K. S. Peggs, T. Merghoub, J. Vider, X. Fan, R. Blasberg, H. Yagita, P. Muranski, P. A. Antony, N. P. Restifo, and J. P. Allison. 2010. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med* 207: 637-650.

124. von Geldern, M., B. Simm, M. Braun, E. H. Weiss, D. J. Schendel, and C. S. Falk. 2006. TCR-independent cytokine stimulation induces non-MHC-restricted T cell activity and is negatively regulated by HLA class I. *Eur J Immunol* 36: 2347-2358.
125. de Oliveira, S., C. C. Reyes-Aldasoro, S. Candel, S. A. Renshaw, V. Mulero, and A. Calado. 2013. Cxcl8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. *J Immunol* 190: 4349-4359.
126. Deshmane, S. L., S. Kremlev, S. Amini, and B. E. Sawaya. 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 29: 313-326.
127. Zhou, Z., C. Zhang, J. Zhang, and Z. Tian. 2012. Macrophages help NK cells to attack tumor cells by stimulatory NKG2D ligand but protect themselves from NK killing by inhibitory ligand Qa-1. *PLoS One* 7: e36928.
128. Cote, C. K., N. Van Rooijen, and S. L. Welkos. 2006. Roles of macrophages and neutrophils in the early host response to *Bacillus anthracis* spores in a mouse model of infection. *Infect Immun* 74: 469-480.
129. Ruhland, M. K., A. J. Loza, A. H. Capietto, X. Luo, B. L. Knolhoff, K. C. Flanagan, B. A. Belt, E. Alspach, K. Leahy, J. Luo, A. Schaffer, J. R. Edwards, G. Longmore, R. Faccio, D. G. DeNardo, and S. A. Stewart. 2016. Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis. *Nat Commun* 7: 11762.
130. Rincon, M., J. Anguita, T. Nakamura, E. Fikrig, and R. A. Flavell. 1997. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 185: 461-469.
131. Diehl, S., and M. Rincon. 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 39: 531-536.
132. Zhu, Y., T. Tchkonja, H. Fuhrmann-Stroissnigg, H. M. Dai, Y. Y. Ling, M. B. Stout, T. Pirtskhalava, N. Giorgadze, K. O. Johnson, C. B. Giles, J. D. Wren, L. J. Niedernhofer, P. D. Robbins, and J. L. Kirkland. 2016. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* 15: 428-435.
133. Chang, J., Y. Wang, L. Shao, R. M. Laberge, M. Demaria, J. Campisi, K. Janakiraman, N. E. Sharpless, S. Ding, W. Feng, Y. Luo, X. Wang, N. Aykin-Burns, K. Krager, U. Ponnappan, M. Hauer-Jensen, A. Meng, and D. Zhou. 2016. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* 22: 78-83.
134. Mestas, J., and C. C. Hughes. 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172: 2731-2738.
135. Shi, Y., C. H. Liu, A. I. Roberts, J. Das, G. Xu, G. Ren, Y. Zhang, L. Zhang, Z. R. Yuan, H. S. Tan, G. Das, and S. Devadas. 2006. Granulocyte-

- macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res* 16: 126-133.
136. Wilkinson, P. C., and I. Newman. 1992. Identification of IL-8 as a locomotor attractant for activated human lymphocytes in mononuclear cell cultures with anti-CD3 or purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 149: 2689-2694.
 137. Krieger, M., T. Brunner, S. C. Bischoff, V. von Tscharner, A. Walz, B. Moser, M. Baggiolini, and C. A. Dahinden. 1992. Activation of human basophils through the IL-8 receptor. *J Immunol* 149: 2662-2667.
 138. Qian, B. Z., J. Li, H. Zhang, T. Kitamura, J. Zhang, L. R. Campion, E. A. Kaiser, L. A. Snyder, and J. W. Pollard. 2011. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 475: 222-225.
 139. Bischoff, S. C., M. Krieger, T. Brunner, and C. A. Dahinden. 1992. Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J Exp Med* 175: 1271-1275.
 140. Shen, J. Z., J. Morgan, G. H. Tesch, P. J. Fuller, and M. J. Young. 2014. CCL2-dependent macrophage recruitment is critical for mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis, inflammation, and blood pressure responses in male mice. *Endocrinology* 155: 1057-1066.
 141. Korholz, D., S. Gerdau, J. Enczmann, N. Zessack, and S. Burdach. 1992. Interleukin 6-induced differentiation of a human B cell line into IgM-secreting plasma cells is mediated by c-fos. *Eur J Immunol* 22: 607-610.
 142. Weissenbach, M., T. Clahsen, C. Weber, D. Spitzer, D. Wirth, D. Vestweber, P. C. Heinrich, and F. Schaper. 2004. Interleukin-6 is a direct mediator of T cell migration. *Eur J Immunol* 34: 2895-2906.
 143. Chomarat, P., J. Banchereau, J. Davoust, and A. K. Palucka. 2000. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 1: 510-514.
 144. Van Epps, H. L. 2006. IL-6 drives T cell proliferation. *The Journal of Experimental Medicine* 203: 1387-1387.
 145. Tchaikovski, V., J. Fellbrich G Fau - Waltenberger, and J. Waltenberger. The molecular basis of VEGFR-1 signal transduction pathways in primary human monocytes.
 146. Li, C., Z. Liu B Fau - Dai, Y. Dai Z Fau - Tao, and Y. Tao. Knockdown of VEGF receptor-1 (VEGFR-1) impairs macrophage infiltration, angiogenesis and growth of clear cell renal cell carcinoma (CRCC).
 147. Kumon, Y., T. Hosokawa T Fau - Suehiro, Y. Suehiro T Fau - Ikeda, J. D. Ikeda Y Fau - Sipe, K. Sipe Jd Fau - Hashimoto, and K. Hashimoto. Acute-phase, but not constitutive serum amyloid A (SAA) is chemotactic for cultured human aortic smooth muscle cells.

148. Montane, J., G. Bischoff L Fau - Soukhatcheva, D. L. Soukhatcheva G Fau - Dai, G. Dai Dl Fau - Hardenberg, M. K. Hardenberg G Fau - Levings, P. C. Levings Mk Fau - Orban, T. J. Orban Pc Fau - Kieffer, R. Kieffer Tj Fau - Tan, C. B. Tan R Fau - Verchere, and C. B. Verchere. Prevention of murine autoimmune diabetes by CCL22-mediated Treg recruitment to the pancreatic islets.
149. van de Laar, L., A. M. Coffe Pj Fau - Woltman, and A. M. Woltman. Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy.
150. Bender, A. T., D. Ostenson Cl Fau - Giordano, J. A. Giordano D Fau - Beavo, and J. A. Beavo. Differentiation of human monocytes in vitro with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor produces distinct changes in cGMP phosphodiesterase expression.
151. Petrovic-Djergovic, D., S. Popovic M Fau - Chittiprol, H. Chittiprol S Fau - Cortado, R. F. Cortado H Fau - Ransom, S. Ransom Rf Fau - Partida-Sanchez, and S. Partida-Sanchez. CXCL10 induces the recruitment of monocyte-derived macrophages into kidney, which aggravate puromycin aminonucleoside nephrosis.
152. Ouwendijk, W. J., V. Abendroth A Fau - Traina-Dorge, S. Traina-Dorge V Fau - Getu, M. Getu S Fau - Steain, M. Steain M Fau - Wellish, A. C. Wellish M Fau - Andeweg, A. D. M. E. Andeweg Ac Fau - Osterhaus, D. Osterhaus Ad Fau - Gilden, G. M. G. M. Gilden D Fau - Verjans, R. Verjans Gm Fau - Mahalingam, and R. Mahalingam. T-cell infiltration correlates with CXCL10 expression in ganglia of cynomolgus macaques with reactivated simian varicella virus.
153. Champion, J. A., A. Walker, and S. Mitragotri. 2008. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm Res* 25: 1815-1821.